

THÈSES

présentées à la

FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(*Diplôme d'Etat*)

par

R. LELUC

Pharmacien

Lauréat de la Faculté

Lauréat des Hôpitaux de Paris

Chef de Travaux Pratiques à la Faculté de Pharmacie de Paris

Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

Première Thèse :

**Analyse chimique et microbiologique d'un protéolysat naturel :
le Nuoc Mam.**

**Utilisation des antagonistes analogues de certains acides
aminés pour leurs dosages microbiologiques dans le Nuoc
Mam et dans des protéolysats médicamenteux.**

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 5 février 1969

JURY {	Mlle S. LAMBIN	<i>Président</i>
	MM. A. GERMAN	<i>Professeur</i>
	A. DESVIGNES	<i>Maitre de Conférences</i>

I M P R I M E R I E

R. FOULON & C^{ie}

29, RUE DEPARCIEUX, 29

PARIS — 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549931_0021

THÈSES

présentées à la

FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

R. LELUC

Pharmacien

Lauréat de la Faculté

Lauréat des Hôpitaux de Paris

Chef de Travaux Pratiques à la Faculté de Pharmacie de Paris

Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

Première Thèse :

**Analyse chimique et microbiologique d'un protéolysat naturel :
le Nuoc Mam.**

**Utilisation des antagonistes analogues de certains acides
aminés pour leurs dosages microbiologiques dans le Nuoc
Mam et dans des protéolysats médicamenteux.**

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 5 février 1969

JURY	{	Mlle S. LAMBIN	Président
		MM. A. GERMAN	Professeur
		A. DESVIGNES	Maitre de Conférences

I M P R I M E R I E
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1969

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM.	P. MALANGEAU		<i>Doyen</i>
	M. GUILLOT	* O.	<i>Assesseur</i>
	P. DELAVEAU		<i>Assesseur</i>
	L. RODINEAU	*	<i>Secrétaire général</i>
Mme	S. FERRARI		<i>Attaché principal A.U.</i>
	L. JEANDEL		<i>Attaché A.U.</i>
Mme	M.L. ESPINASSE		<i>Attaché A.U.</i>
	A. BRENN	*	<i>Attaché A.U.</i>
	A. JACOB	*	<i>Attaché A.U.</i>
Mme	A.M. MUR		<i>Attaché A.U.</i>
Mlle	E. FRIZOL		<i>Attaché A.U.</i>
	J.N. TRICAN		<i>Attaché A.U.</i>

DOYEN HONORAIRE

M. Guillaume VALETTE * O.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. L. LAUNOY * O. - P. FLEURY * O. - M. PICON * O.

PROFESSEURS

MM.	M.M. JANOT	* O.	Pharmacie galénique (T)
	<i>(Membre de l'Institut)</i>		
	G. VALETTE	* O.	Pharmacodynamie (T)
	R. PARIS	* O.	Matière médicale (T)
	M. GUILLOT	* O.	Physique (T)
	J.A. GAUTIER	* O.	Chimie organique (T)
Mlle	S. LAMBIN	*	Microbiologie (T)
	Y. RAOUL	*	Physiologie (T)
	J. COURTOIS	*	Chimie biologique (T)
	L. DOMANGE	* O.	Chimie générale et minérale (T)
	R. TRUHAUT	* O.	Toxicologie et hygiène industrielle (T)
	<i>(Membre de l'Institut)</i>		
	A. MORETTE	*	Hydrologie (T)
	P. CAVIER	*	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER	*	Hygiène et Education sanitaire (T)
	R. MOREAU	*	Pharmacie chimique (T)
	A. GERMAN		Microbiologie (T)
	M. PIETTE	*	Hématologie (T)
	P. MALANGEAU		Chimie analytique (T)
	M. GIRARD	*	Biochimie appliquée (T)
	G. DILLEMANN		Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
	G. DEYSSON	*	Botanique (T)
	J. FLAHAUT		Minéralogie (T)
	J. RENAULT		Chimie organique (T)
	A. LE HIR		Pharmacie galénique (T)
	C. BOUDENE		Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
	P. LARUELLE		Physique (T)
	P. ROSSIGNOL		Pharmacodynamie (T)
	A. MANGEOT		Pharmacie galénique industrielle
	P. DELAVEAU		Séméiologie et Pathologie générale (T)
	Y. COHEN		Pharmacodynamie
	H. RENAULT		Physique
	R. BOURDON		Chimie analytique
	P. REYNAUD		Pharmacie chimique
	R. LE MOAN		Toxicologie
	J. POISSON		Pharmacie galénique
	R. MICHEL		Endocrinologie (T)
	M. LECLERC		Hématologie
	F. PERCHERON		Chimie biologique
	J. SAVEL		Biologie animale

MAITRES DE CONFERENCES

MM. C. PAOLETTI	Toxicologie
A. DESVIGNES	Cryptogamie et Technique bactériologique
J. BORY	Microbiologie
M. MIOCQUE	Chimie organique
J.L. GUIGNARD	Botanique générale
J.C. GOUNELLE	Physiologie
P. BINET	Biologie animale
C. COMBET-FARNOUX	Chimie organique
Mme M. PLAT	Législation et Déontologie pharmaceutique
E. DELACOUX	Pharmacie chimique
M. DUCHON D'ENGENIERES.	Chimie organique
C. ADOLPHE	Physique
M. GUERNET	Chimie analytique
J. DIDRY	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales
P. KHODADAD	Chimie minérale
F. PUISIEUX	Pharmacie galénique
H. GUERIN (<i>Chargé de cours</i>) ..	Matière médicale
R. PERLES (<i>dél.</i>)	Chimie biologique
J. YONGER (<i>dél.</i>)	Chimie analytique
J. MESTRE (<i>dél.</i>)	Botanique
J. RIVET (<i>dél.</i>)	Chimie générale et minérale
G. HAZEBROUCQ (<i>dél.</i>)	Physique
P. BOURRINET (<i>dél.</i>)	Hygiène
J. ETIENNE (<i>dél.</i>)	Mathématiques
Ch. SOULEAU (<i>dél.</i>)	Chimie générale et minérale
M. HAMON (<i>dél.</i>)	Chimie analytique
J. AGNERAY (<i>dél.</i>)	Biologie
C. DREUX (<i>dél.</i>)	Biochimie appliquée
F. ROUSSELET (<i>dél.</i>)	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

MM. P. GESTEAU * - H. GUERIN *
Mme M. HARISPE - Mlle S. LONGUEVALLE

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

(*Liste alphabétique*)

MM. Yves ADAM	Pharmacie chimique
Pierre AYMARD	E.D. Physiologie
Mlle Suzanne BARNIER (<i>dél.</i>)	Mathématiques
Mlle Jacqueline BERNARD	T.P. Microbiologie
Pierre BESANÇON (<i>dél.</i>)	Mathématiques
Mme M. Philippe BIGET (<i>dél.</i>)	Mathématiques
Mme Jeannine BLANC	E.D. Chimie organique 1 ^{re} A.
Mme Jacqueline BONALY (<i>dél.</i>)	T.P. Botanique 1 ^{re} A.
Mlle Claude BOURNIQUE	T.P. Physiologie végétale
Michel BRALET	E.D. Botanique 1 ^{re} A.
Jacques CANAL (<i>dél.</i>)	Biochimie appliquée 5 ^e A.
Alain CARLIER	C.E.S. Pharmacie galénique industrielle
Daniel CARRE (<i>dél.</i>)	Mathématiques
Mlle Clothilde CARRERE	T.P. Microbiologie 4 ^e A.
Mme Jacqueline CENAC	C.E.S. Parasitologie
Henri CERCEAU (<i>dél.</i>)	T.P. Chimie minérale
Mme Madeleine CHARPENTIER	E.D. Chimie générale et minérale
J.-Marie CHERON (<i>dél.</i>)	Chimie biologique
Mlle Marguerite CHOIX	T.P. Pharmacie galénique
Mlle Geneviève CLAIR	E.D. Essais Médicaments végétaux
Christian DAGRON	E.D. Chimie générale et minérale
Jean DAVY (<i>dél.</i>)	C.E.S. Biochimie
Mlle M.-Thérèse DECAUDIN	T.P. Parasitologie 4 ^e A.
Jacques DELATTRE (<i>dél.</i>)	Biochimie appliquée
Alain DELCOURT (<i>dél.</i>)	T.P. Botanique
Alexandre DOUSSIN (<i>dél.</i>)	T.P. Chimie analytique 5 ^e A.
Mlle Geneviève DUMANT	C.E.S. Contrôle Médicaments (physico-chim.)
Mme Charlotte DUPONT	P.T. Pharmacodynamie
Guy ETIENNE	T.P. Pharmacie galénique

Mme Liliane FAURE (dél.)	E.D. Chimie organique
Mlle Solange FLEURY	E.D. Chimie analytique 2 ^e A.
Mlle Anne-Marie FOGLIETTI	T.P. Chimie biologique
François GIRARDEAU (dél.)	T.P. Chimie organique
Jean GOBERT (dél.)	T.P. Zoologie 1 ^{re} A.
Mlle Marie-José GOURSAT	E.D. Botanique
J.-Louis GROSSIORD (dél.)	T.P. Physique
Mlle Edith GUILLOUX (dél.)	T.P. Chimie biologique
Jean HARISPE *	T.P. Chimie organique 2 ^e A.
Jacques HENRY	Essais Médicaments chimiques et galéniques
Mme Jeanne HUBERT	C.E.S. Bactériologie Immunologie
Mme Maud JULIEN	E.D. Physique
René JULIEN	E.D. Chimie générale et minérale
Mlle Yvonne JUND	C.E.S. Microbiologie Bactériologie
Pierre LALEGERIE (dél.)	C.E.S. Biochimie
Jacques LAROCHE	Hygiène et Education sanitaire
Michel LEBCEUF	C.E.S. Pharmacotechnie galénique
Mme Yvette LEDUC	Chimie analytique
Lucien LEGENDRE (dél.)	Chimie organique
Mme Nicole LEGER	Parasitologie 5 ^e A.
Georges LELUAN	Bactériologie
Robert LELUC	T.P. Microbiologie 4 ^e A.
René LEMAY	Législation
Alain LEMONNIER	T.P. Chimie analytique quantitative
Christian LEPAREUR (dél.)	Mathématiques
Mme Thuan LEQUANG (dél.)	T.P. Chimie analytique
Pierre LEVILLAIN	E.D. Chimie analytique 1 ^{re} A.
Mme Françoise LEVY (dél.)	E.D. Botanique 2 ^e A.
Joseph LIKFORMAN	E.D. Physique 1 ^{re} A.
Mlle Monique LONGEVIALLE	E.D. Botanique 1 ^{re} A.
Jean MACCARIO (dél.)	Mathématiques
Georges MAHUZIER	T.P. Chimie analytique qualitative
Jean MANDEREAU	C.E.S. Pharmacotechnie chimique
Léon MANET (dél.)	Chimie biologique
Henry MARTIN-FRERE	T.P. Chimie générale et minérale 1 ^{re} A.
Yves MAUGUEN (dél.)	Mathématiques
Mlle Annick MICHELET	E.D. Chimie générale et minérale
Mlle Hélène MORIN	C.E.S. Pharmacodynamie
Mme Jacqueline MOURY	T.P. Zoologie 4 ^e A.
Phu Lich N'GUYEN (dél.)	C.E.S. Toxicologie
Mme M. Jacqueline NOTTEGHEM	T.P. Parasitologie 4 ^e A.
Mme Jacqueline PANOUSE	Microbiologie
Mme Françoise PAOLAGGI (dél.)	C.E.S. Electrochimie
Michel PARIS	C.E.S. Contrôle Médicaments (biologie)
Jean PESTIS	T.P. Anatomie et Physiologie humaines
Mme Colette PIETTE	Hématologie
Pierre POUILLAIN	C.E.S. Hématologie
Jean-Louis POUISSET	Chimie extractive
Pierre QUENEZ (dél.)	T.P. Chimie générale et minérale
Mme Monique ROBERT	C.E.S. Immunologie et Microbiologie
Noël RODIER (dél.)	T.P. Physique 2 ^e A.
Mlle Alice ROLLEN *	T.P. Botanique 1 ^{re} A.
Mlle Renée ROUSSELET	Essais Médicaments végétaux
Mme M. RUDLER (dél.)	T.P. Chimie organique
Mme Nicole SALES (dél.)	Physiologie
Jean SCHUSTER	Toxicologie
Mlle Claudine SORIA (dél.)	Biochimie appliquée
Mme Monique SEILLER	T.P. Pharmacie galénique industrielle
Mlle Nicole STRUPLER	E.D. Chimie générale et minérale
Trieu THUONG CONG	T.P. Chimie analytique quantitative
Mlle Solange TROUPEL (dél.)	T.P. Chimie analytique quantitative
J.-Michel VIERFOND (dél.)	E.D. Chimie organique
Jacques VILLERS	Physique
Mme Josette WELBY (dél.)	Pharmacie galénique

BIBLIOTHEQUE

Mlle Y. RUYSSSEN *	Conservateur en chef
Mme A. DESGRIPPE	Conservateur
Mlle A.D. BOUVRESSE	Bibliothécaire
Mme M.A. COULET	Bibliothécaire
Mlle C. LANGLOIS	Bibliothécaire

A MADEMOISELLE LE PROFESSEUR S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris

*Qui nous a toujours utilement conseillé
et guidé.*

*Qui nous a fait l'honneur de présider
le jury de cette thèse.*

*Et pour l'intérêt qu'elle a bien voulu
porter à ce travail.*

*En témoignage de sincère et respectueuse
reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. GERMAN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux

*Qui nous a aidé et conseillé au cours de
nos différents travaux et nous a fait l'hon-
neur de faire partie du jury de cette thèse.*

*En souvenir des années passées ensemble
à l'Hôpital de Bicêtre.*

*En témoignage de ma sincère et respec-
tueuse reconnaissance.*

A MONSIEUR A. DESVIGNES

Maître de Conférence

*Qui nous a fait l'honneur de faire partie
du jury de cette thèse.*

*En témoignage de notre respectueuse
reconnaissance.*

A MON AMI

ALAIN LEMONNIER

Pharmacien-Chef à l'Hôpital de Bicêtre

A MON AMI

THUONG CONG TRIEU

Assistant de Biologie à l'Hôpital de Bicêtre

A MESDAMES

FRANÇOISE BARTHON ET YVONNE GREMELLE,

CLAUDINE AZZAM

A MADEMOISELLE CHRISTIANE CHARPENTIER

*Pour l'aide qu'ils nous ont apportée lors
du présent travail.*

Introduction

- I) Définition et mode de préparation du Nuoc Mam
- II) Composition chimique du Nuoc Mam
- III) Echantillons de Nuoc Mam analysés dans le présent travail



On peut définir le Nuoc Mam comme le résultat d'activités enzymatiques concernant la dégradation de la chair de poissons. Ces activités correspondent en majorité à des protéolyses dues, vraisemblablement, soit à des enzymes digestifs présents dans les cellules des poissons, soit à l'action fermentative de bactéries anaérobies [1, 2].

De très nombreux travaux concernant ce que l'on a encore appelé la sauce de poisson vietnamienne ou encore, eau de poisson salé, ont été publiés. Les uns sont relatifs au mode de préparation, les autres correspondent à des études analytiques portant principalement sur les produits de dégradation des protéines dont les acides aminés.

I. — Le mode de préparation et le choix des poissons

A) Ce mode de préparation a été très bien décrit par ROSE [3, 4, 5] et par GUILLERM [6, 7], GUILLERM et VIALARD GOUDOU [8], CHAT [9], Nguyễn-Luong KHUONG [10], MESNARD et ROSE [11].

Il comprend le choix des poissons, la mise en cuve du poisson additionné de sel, une première macération de trois jours, suivie de soutirage d'un premier jus ou Nuoc Boi, d'une seconde macération beaucoup plus longue (quelques mois) donnant un produit très riche ou Nuoc Nhut et enfin, d'un épuisement par lixivation, obtenu par addition de liquides de macération provenant de cuves anciennes et d'eau salée. Le liquide ainsi obtenu est le Nuoc Mam.

B) Les principaux poissons utilisés sont :

- *Les Ca-nuc* :
Famille des Carangidés (*Decapterus Russelli*) dont la pêche a lieu de mai à septembre.
- *Les Ca-moi* :
Famille des Clupeidés dont la pêche a lieu de mai à février.
- *Les Ca-Lâm* :
Famille des Dussumieridés (*Spratelleides delicatulus*) dont la pêche a lieu de février à mai.
- *Les Ca-lép* :
Famille des Engraulidés ou Anchois dont la pêche a lieu de février à mai.
- *Les Ca-com* :
Pêchés principalement vers Lagàn à l'intermousson. Ce sont des Engraulidés.
- *Les Ca-tap* :
Poissons de différentes espèces dont la pêche a lieu toute l'année.

Il faut, en outre, noter que des essais de fabrication ont été réalisés à partir d'autres poissons et dans des régions différentes, en particulier à Dakar et en France [21].

II. — Composition chimique du Nuoc Mam

On obtient par les manipulations décrites ci-dessus un liquide dont la couleur varie du jaune pâle au jaune ambré, selon les régions ou le procédé de fabrication. Le liquide présente une teneur en chlorure de sodium très élevée (p. 50) et correspond en majeure partie à un protéolysat riche en dérivés azotés.

De très nombreuses publications relatives à des déterminations chimiques ont été effectuées sur le Nuoc Mam. La présence de nom-

breux acides aminés a été maintes fois corroborée, ceci expliquant l'intérêt alimentaire du produit, intérêt souligné par une production augmentant sans cesse *.

Parmi les autres substances organiques qui ont fait l'objet de recherches ou de dosages, on peut citer les peptides [12], les amines volatiles, l'ammoniaque [13], l'histamine, l'urée [8], la créatinine [21], l'indol, l'acide bêta-indolacétique [33], les acides organiques volatils (acide acétique, acide n-butyrique, acide lactique, acide formique). Ces composés ont été soit mis en évidence, soit dosés [14, 15, 16]. Egalement l'alcool éthylique [17], l'alcool méthylique [18], des corps cétoniques et cétoènes, dont les méthylcétones [19, 20] ont été identifiés ou évalués.

Au sujet des vitamines, il semble que l'on puisse affirmer l'absence de thiamine, de riboflavine et de pyridoxine [20]. Par contre, la cyanocobalamine existe à un taux décelable microbiologiquement [200].

Les éléments minéraux, dont le chlorure de sodium constitue la presque totalité, ont fait l'objet également de nombreux travaux. Les éléments suivants ont été dosés : le phosphore [22], le soufre minéral [23], le calcium [24], le fer [24], le magnésium [24], l'iode [25], le brome [25], l'arsenic [26] et le fluor [27].

Le présent travail n'a pas pour but de reprendre l'ensemble des déterminations précitées. Il a pour objet, compte tenu de techniques plus précises, de vérifier certains points qui sont infirmés par les uns et affirmés par les autres.

De plus, l'importance des acides aminés contenus dans le Nuoc Mam nous a incité à rechercher pour certains d'entre eux, des méthodes de dosages plus sensibles que celles précédemment décrites, en particulier des méthodes microbiologiques basées sur l'utilisation d'un phénomène biochimique très intéressant et relatif à une croissance bactérienne inhibée par un antagoniste analogue d'un acide aminé. Cette inhibition peut être levée par addition quantitative de l'acide aminé. Ceci permet d'envisager l'élaboration de dosages microbiologiques de métabolites essentiels, basés sur l'utilisation d'une bactérie dont la croissance en réalité va dépendre au niveau du milieu d'un seul rapport : taux en analogue inhibiteur/taux en 1 acide aminé. Ces méthodes microbiologiques diffèrent donc essentiellement des méthodes classiques employant des souches bactériennes dépendantes d'un acide aminé ou d'une vitamine.

(1) En 1965-1966-1967, la production annuelle a été d'environ 60 millions de litres pour le Vietnam du Sud. (Chiffre communiqué par le Secrétaire Général du Syndicat des Producteurs de Nuoc Mam du Sud-Vietnam, 87 Bai Lo, Cong-Hoa, Saigon.)

III. — Echantillons de Nuoc Mam analysés dans ce travail

Les différents Nuoc Mam que nous avons analysés sont référencés comme suit :

- Echantillon NM 1 :
Marque Kim Lien.
Origine : Phan Thiêt (Muiné).
Centre Vietnam. Mer de Chine ¹.
- Echantillon NM 2 :
Origine : île de Phu Quoc.
Golfe de Siam. Fabrication familiale.
- Echantillon NM 3 :
Fabrication française A.G.D.E. (Hérault), à base de sardine
et d'anchois.
- Echantillon NM 4 :
Origine : Mui-hé (Phan Thiêt).
Centre Vietnam. Mer de Chine ².
- Echantillon NM 5 :
Origine : île de Phu-Quôc ³.
- Echantillon NM 6 :
Ile de Phu-Quôc à base de Ca com (golfe de Siam).
- Echantillon NM 7 :
Crevette. Fabrication artisanale.
Mer de Chine

(1) Adresse : Etablissements Kim Lien, 180, quai de Belgique, Saïgon.

(2) Adresse : Minh Sanh, 258 Bên Chuong Duong, Saïgon.

(3) Adresse : Dong Hung, Saïgon. Distribué en France par Sodpic, 105, rue des Moines, Paris.

Chapitre 1

Etude bactériologique

- I) Numération des germes par la méthode des membranes filtrantes
- II) Essais d'identification
- III) Mise en évidence d'une activité bactériostatique éventuelle

* *

L'étude bactériologique effectuée lors de nos essais concernant le Nuoc Mam avait un double but :

Dans une première série d'essais, nous avons essayé de déterminer le degré de pollution latent existant dans différents échantillons de Nuoc Mam en nous inspirant des techniques officiellement reconnues en France pour l'analyse bactériologique des eaux. A cette étude quantitative s'est ajoutée une étude qualitative ayant pour but d'identifier les bactéries numérées.

Dans une seconde série d'essais, nous avons essayé de mettre en évidence une activité bactériostatique éventuelle.

I. — Etudes numériques

1) Ces études ont été effectuées en utilisant la technique des membranes filtrantes adoptée pour les essais de stérilité par la plupart des Pharmacopées dont la Pharmacopée française [28].

Le matériel employé est celui de la firme Millipore¹.

2) Les membranes après filtration du Nuoc Mam ont été déposées sur cinq milieux différents, tous gélosés :

- un milieu gélosé glucosé (pH 7-7,2) pour la numération des germes aérobies ;
- un milieu au sulfite de sodium et à l'alun de fer utilisé pour la recherche des clostridium sulfitoréducteurs [29].

Cette recherche avait pour but de mettre en évidence des bactéries anaérobies dont les activités enzymatiques sont en partie à l'origine de la formation du Nuoc Mam [1, 2] ;

- un milieu lactosé additionné de triphényl-tétrazolum et de tergitol 7, l'indicateur de pH étant le bleu de bromothymol [29] pour la mise en évidence de la numération d'*Escherichia coli*, la température d'incubation étant de 44°C ;
- un milieu à base d'azide de sodium [29] pour la mise en évidence et la numération de *Streptococcus faecalis* ;
- un milieu classique de Sabouraud additionné de 0,5 g % de chloramphénicol pour la mise en évidence et la numération des champignons inférieurs.

Les milieux pour la recherche et les numérations des bactéries, des Clostridium sulfitoréducteurs, des streptocoques fécaux ont été placés pendant soixante-douze heures à l'étuve à 37°C, et le milieu pour la recherche d'*Escherichia coli* à l'étuve à 44°C pendant également soixante-douze heures. Le milieu de Sabouraud a été placé à l'étuve à 25°C pendant sept jours. Aux délais indiqués ci-dessus, on a procédé à la numération des colonies apparues.

3) Les résultats que nous avons obtenus en suivant exactement les conditions opératoires ci-dessus, nous ont permis de nous assurer que les divers échantillons de Nuoc Mam :

- ne renfermaient pas d'*Escherichia coli*, de *Streptococcus faecalis*, de Clostridium sulfitoréducteurs, ni de champignons inférieurs ;

(1) Tous les essais ont été effectués sur appareillage Millipore, type Sterifil. Les membranes utilisées ont pour référence HAWG 047/AO 0,45 μ . Adresse : Millipore S.A., 39, rue Chausselot, 92-Malakoff.

- contenaient systématiquement des germes aérobies, ceci en quantité non négligeable, comme le prouvent les chiffres ci-dessous :

Référence des échantillons examinés	Germes par litre
NM 2	30.000
NM 3	1.000
NM 4	290.200
NM 5	360.400
NM 6	510.000
NM 7	110.000

Ainsi, dans ce milieu hypersalé, des bactéries aérobies sont susceptibles de survivre sans provoquer de fermentation ayant pour effet la dénaturation du Nuoc Mam.

Le plus souvent, pour ne pas dire systématiquement, nous avons constaté la présence de deux sortes de colonies :

- des colonies épaisses, blanc grisâtre (99 % des colonies numé-
rées);
- des colonies pigmentées en jaune franc, ces dernières repré-
sentant un pourcentage très faible (de l'ordre de 1 %).

II. — Essais d'identification des colonies observées lors de la numération sur milieu gélosé pH 7-7,2

Trois séries d'essais ont été effectuées. Elles concernent les échan-
tillons de Nuoc Mam référencés NM 5, NM 2 et NM 7. Le tableau
ci-après indique les principaux milieux utilisés en vue de mettre
en évidence les activités biochimiques des bactéries aérobies isolées.
Les résultats obtenus y figurent également (*Tableau I*).

L'examen des résultats concernant les bactéries aérobies mises
en évidence dans divers échantillons de Nuoc Mam montre que l'iden-
tification de ces bactéries semble assez difficile à réaliser si l'on s'en
tient aux épreuves résumées dans le tableau ci-dessus. Il est certain
que l'on peut affirmer l'absence de *Microccaceæ* et d'*Enterobacte-
riaceæ*.

La famille des *Pseudomonadaceæ* ne doit peut-être pas être écar-
tée, mais elle ne peut être admise que dans un sens restrictif, car

nous n'avons observé aucune colonie dont la pigmentation intense diffuse dans les milieux gélosés. De plus, le genre *halobacterium* de cette famille ne semble pas devoir être retenu, puisque le dépôt des membranes filtrantes sur un milieu gélosé hypersalé à 15 g % ne provoque pas d'exaltation de la croissance, mais au contraire a eu pour conséquence une diminution de celle-ci.

Il semble probable que certaines bactéries rencontrées puissent être classées dans la famille des *Achromobacteriaceæ* dont les trois principaux genres sont : le genre *alcaligenes*, le genre *achromobacter* et le genre *flavobacterium*.

III. — Etude d'une activité bactériostatique éventuelle

Nous avons utilisé la technique des dilutions croissantes en milieu liquide. A une même quantité de milieu de culture¹ préalablement ensemencé a été ajouté 1 ml de Nuoc Mam pur ou de sa dilution. Les dilutions de Nuoc Mam ont été faites en eau distillée stérile.

L'ensemencement du milieu de culture a été réalisé au préalable par addition à 100 ml de milieu de 0,1 ml d'une suspension de germes obtenus par dilution au 1/100.000^e, d'une culture en bouillon peptoné salé âgée de seize heures. Pour éviter une répartition hétérogène des germes, le milieu de culture préalablement ensemencé a été introduit dans les tubes à essai sous agitation constante.

A titre comparatif, nous avons utilisé une solution de chlorure de benzalkonium titrée à 0,1 % ; cette solution de référence a été diluée secondairement à l'aide d'eau distillée. La solution ou les dilutions ont été alors additionnées au milieu de culture, comme il est indiqué plus haut.

Les germes sur lesquels l'activité bactériostatique du Nuoc Mam a été étudiée sont :

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 P)² ;
- *Escherichia coli* 0111 B 4 (Institut Pasteur 51.58) ;
- *Proteus vulgaris* (Institut Pasteur A 232) ;
- *Bacillus subtilis* (Institut Pasteur A 155).

• Résultats :

La lecture des résultats a été effectuée après quarante-huit heures d'étuve à 37°C.

(1) Bouillon peptoné salé, pH 7-7,2.

(2) American Type Culture Collection. Rockville, Maryland, U.S.A.

Dans les conditions opératoires ci-dessus précisées, les échantillons de Nuoc Mam référencés NM 4, NM 5, NM 6, NM 7 et NM 2 n'ont présenté aucune activité bactériostatique. Pour fixer un ordre de grandeur, la dilution au $1/5^e$ de la solution de chlorure de benzalkonium à 0,1 % s'est montrée encore très active sur le staphylocoque.

Partie I : Morphologie - Coloration - Mobilité

(1) Les colonies prélevées sur la gélose pH 7-7,2 n'ont pas présenté de croissance sur le milieu d'identification.

Partie II : Etude enzymatique

(1) Les colonies prélevées sur la gélose pH 7-7,2 n'ont pas présenté de croissance sur le milieu d'identification.

Chapitre 2

Etudes chromatographiques ou électrophorétiques qualitatives

- I) Etude des acides aminés dans leur ensemble
 - *les systèmes chromatographiques utilisés*
 - *l'avantage de la chromatographie électrophorèse*
- II) Mise en évidence de molécules peptidiques
- III) Etude du tryptophane et de ses métabolites
- IV) Etude concernant l'histamine
 - *les systèmes chromatographiques utilisés*
 - *les essais physiologiques, à titre comparatif*
- V) Etude de l'histidine et de ses métabolites
 - *présence éventuelle de méthyl-histidine*
- VI) Etude des acides organiques

* *

Nous avons réalisé les études chromatographiques dont il est question dans le présent chapitre pour les différentes raisons suivantes :

— L'étude des acides aminés considérée dans son ensemble nous a permis de comparer les avantages et les inconvénients présentés

par des méthodes chromatographiques et chromato-électrophorétiques et ainsi de nous assurer de l'avantage de l'une d'entre elles.

- Nous nous sommes efforcé de mettre en évidence des molécules polypeptidiques et peptidiques sur lesquelles l'unanimité des auteurs n'est pas faite.
- Dans un autre ordre d'idée, nous avons étudié les métabolites de deux acides aminés : l'histidine et le tryptophane, compte tenu que des méthodes chromatographiques bien précises peuvent être actuellement employées. Ces études avaient pour but essentiel la mise en évidence de métabolites susceptibles d'interférer dans les dosages microbiologiques que nous préconisons.
- Une série d'essais a eu pour objet la mise en évidence de l'histamine par différentes techniques. Par commodité de présentation, nous avons ajouté à ce paragraphe des essais quantitatifs.
- Enfin, une étude chromatographique concernant les acides organiques a été ajoutée à ce chapitre.

I. — Etude des acides aminés

La mise en évidence chromatographique ou chromato-électrophorétique des acides aminés du Nuoc Mam a été réalisée selon trois techniques différentes.

1° *Chromatographie bidimensionnelle selon la méthode classique utilisant deux solvants*¹ :

Première dimension :

— Phénol	1 kg
— Eau distillée	250 ml
— Ammoniaque	traces déposées dans la cuve, le long de la paroi

Deuxième dimension :

— Butanol	120 ml
— Eau distillée	50 ml
— Acide acétique	30 ml

La révélation est effectuée par une solution alcoolique de ninhydrine à 2 g %.

(1) Papier utilisé : Whatman n° 1.

La stabilisation de la coloration est obtenue par le sulfate de nickel à 6,25 g % dans de l'eau distillée.

2° *Chromatographie bidimensionnelle selon la technique de H. GHADIMI [30] ² :*

Première dimension :

— Pyridine	125 ml
— Acétone	75 ml
— Eau distillée	50 ml

Deuxième dimension :

— Alcool isopropylique	200 ml
— Acide formique	25 ml
— Eau distillée	25 ml

La révélation est réalisée par trempage dans le réactif de Pauly :

- a) — Acide sulfanilique 9 g
- Acide chlorhydrique concentré 90 ml
- Eau distillée 900 ml
- b) — Solution aqueuse de nitrite de sodium à 5 g/100 ml

Mélanger a) et b) à parties égales et neutraliser avant l'emploi par une solution saturée de carbonate de sodium.

3° *Chromatographie-électrophorèse* comprenant deux étapes séparées :

a) Une électrophorèse sur papier Whatman n° 1, dans un milieu tampon de pH acide, permet de séparer les acides aminés en différentes fractions, groupant chacune ceux dont les polarités sont voisines.

b) Une chromatographie réalisée dans un système solvant convenable permet ensuite d'étudier les divers constituants des différentes fractions [31, 32].

L'électrophorèse est conduite dans un milieu tampon pH 1,9.

Le dispositif est en V renversé selon le procédé devenu classique de DURRUM ou MACHEBŒUF, sous une tension de 400 volts.

La solution tampon pH 1,9 a pour formule :

— Acide formique	60 ml
— Acide acétique	360 ml
— Eau distillée, q.s.p.	6 litres

(2) Papier utilisé : Whatman n° 3 M.M.

La chromatographie est effectuée dans le même solvant que celui décrit au sujet de la chromatographie bidimensionnelle (butanol, acide acétique, eau).

La révélation des acides aminés est effectuée comme il est indiqué précédemment (solution alcoolique de ninhydrine et stabilisation de la coloration par le sulfate de nickel).

Les résultats obtenus sont groupés dans le *Tableau II*. Sur ce tableau figurent également les résultats de BLASS et RICHARD [13], et de TRUONG VAN CHOM [21]. L'analyse de l'ensemble permet deux sortes de conclusions : la première en comparant les résultats donnés par les techniques chromatographiques et chromato-électrophorétiques effectuées par nous-même ; la seconde en comparant nos résultats et ceux des auteurs précités.

4° Comparaison des résultats obtenus :

- En comparant les résultats obtenus par les trois techniques employées par nous-même, il nous semble que la chromato-électrophorèse présente des avantages indiscutables. La technique de H. GHADIMI ne nous a donné aucun renseignement complémentaire par rapport à la chromatographie bidimensionnelle classique.

Les avantages de l'électrophorèse-chromatographie concernent (*fig. 1 et 2*) :

- 1° La position des acides aminés, qui est beaucoup plus nette.
- 2° La teneur élevée en chlorure de sodium qui ne gêne donc pas la mise en évidence de l'éthanolamine, de l'acide delta-amino-levulinique, l'acide gamma-amino-butyrique et la taurine, dérivés que nous n'avions pas très bien identifiés par les deux autres techniques.
- 3° La certitude de la présence de tryptophane qui, dans le cas de la chromatographie bidimensionnelle classique, migre avec la valine.

Par contre, un inconvénient est à noter. Il nous a paru impossible de mettre en évidence la présence de thréonine, du fait que celle-ci présente des migrations identiques à l'acide glutamique.

- En comparant nos résultats avec ceux de BLASS et RICHARD [13], et de TRUONG VAN CHOM [21], des différences apparaissent :

— BLASS et RICHARD n'indiquent pas la présence d'histidine que nous avons retrouvée systématiquement, tandis que TRUONG VAN CHOM n'affirme sa présence que dans deux échantillons sur les six échantillons que cet auteur a étudiés. Nous avons pu corroborer la présence d'histidine par une méthode chromatographique plus spécifique (p. 33) et par la méthode microbiologique que nous préconisons (p. 79).

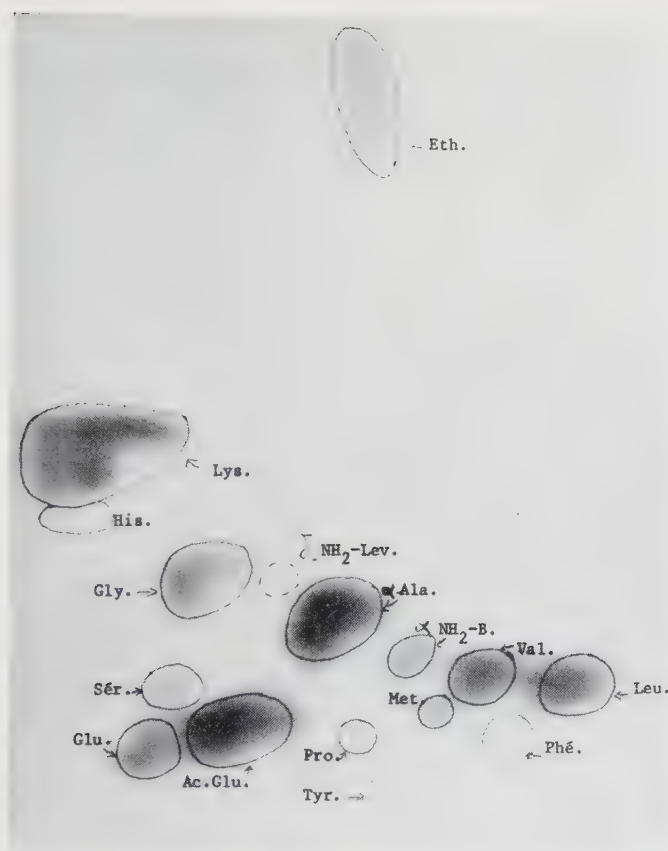


FIGURE 1

Etude chromato-électrophorétique

Référence de l'échantillon: NM 7, dépôt 20 μ l

Légende des abréviations :

Ac. Glu. : Acide glutamique
 α -Ala. : Alpha-alanine
 α -NH₂-B. : Alpha-amino-butirique
 δ -NH₂-Lev. : Delta-amino-lévalinique
Eth. : Ethanoline
Glu. : Glutamine
Gly. : Glycine
His. : Histidine
Leu. : Leucine

Lys. : Lysine
Met. : Méthionine
Phé. : Phénylalanine
Pro. : Proline
Sér. : Sérine
Tyr. : Tyrosine
Val. : Valine

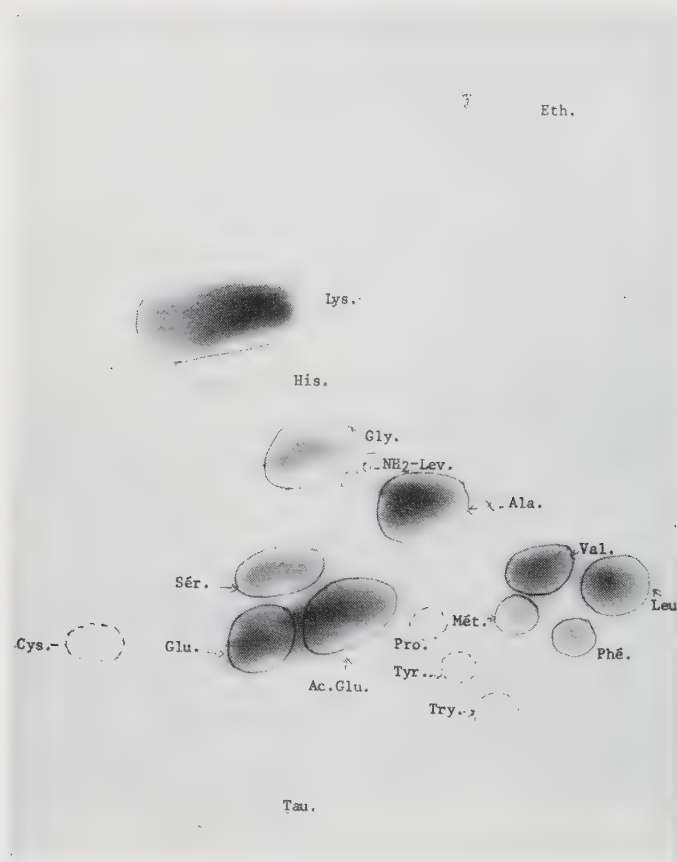


FIGURE 2

Etude chromato-électrophorétique

Référence de l'échantillon de Nuoc Mam : NM 1, dépôt 20 μ l

Légende des abréviations :

Ac. Glu. : Acide glutamique
 α -Ala. : Alpha-alanine
 Cys. : Cystine
 δ -NH₂-Lev. : Delta-amino-lévalinique
 Eth. : Ethanolamine
 Glut. : Glutamine
 Gly. : Glycine
 His. : Histidine
 Leu. : Leucine

Lys. : Lysine
 Met. : Méthionine
 Phé. : Phénylalanine
 Pro. : Proline
 Sér. : Sérine
 Tau. : Taurine
 Try. : Tryptophane
 Tyr. : Tyrosine
 Val. : Valine

TABLEAU II
Résultats obtenus sur les échantillons 1, 2, 3, 4, 5 et 7

	Selon BLASS et RICHARD	Selon TRUONG VAN CHOM	Selon les méthodes utilisées par nous-même						
			Chromato- graphie bi- dimensionnelle	GHADIMI	Chromato- graphie bi- dimensionnelle				
Acide aspartique	+	+	+	+	+	(1)			
Ethanolamine			0	0		+			
Lysine	+	+	+	+		+			
Histidine	0		+	+		+			
Glycine	+	+	+	+		+			
Acide δ amino- lévulinique	0	0	0	0		+			
Alpha-alanine	+	+	+	+		+			
Acide α amino- butyrique	+	+	0	0		+	(2)		
Valine	+	+	+	+		+			
Leucine	+	+	+	+		+			
Méthionine	+	+	(6)	+		+			
Phénylalanine	+	+	+	+		+			
Sérine	+	+	+	+		+			
Glutamine	0	0	+	(1)	+		+		
Acide glutamique	+	+	+	+		+			
Proline	+	+	+	+	(1)		+		
Tyrosine	+	+	+	+		+			
Tryptophane	+	0	+	(3)	+	(2)	+	(2)	
	(7)								
Cystine	0	0	+		0	(4)		+	
Taurine	0	0	0		0			+	(2)
Thréonine	+	+	+		0			0	(5)

(1) difficile à identifier (2) pas dans tous les lots (3) migre avec la valine (4) Rf imprécis (5) migre avec l'acide glutamique	(6) par chromatographie mono- dimensionnelle et révélation par le réactif à l'iodoplatinate de potassium (7) révélation avec le réactif d'Ehrlich
--	--

— De même, les auteurs précités ne font pas mention d'acide delta-amino-lévulinique, de glutamine, de tryptophane, de cystine et de taurine lorsqu'ils utilisent comme révélateur la ninhydrine. Il faut cependant noter qu'au sujet du tryptophane, TRUONG VAN CHOM le met en évidence à l'aide de la réaction de Voisenet, et que BLASS et RICHARD, pour affirmer sa présence, ont employé le réactif d'Ehrlich pulvérisé sur le chromatogramme.

Pour notre part, la présence de tryptophane a été corroborée par la méthode de dosage microbiologique que nous préconisons.

- Que les études chromatographiques de BLASS et RICHARD, et de TRUONG VAN CHOM leur ont permis d'identifier la méthionine sulfoxide que nous n'avons pas trouvée en ne traitant pas au préalable le Nuoc Mam par un oxydant. Pour notre part, nous avons mis en évidence la méthionine dont la présence a été également affirmée lors de nos essais microbiologiques. Cependant TRUONG VAN CHOM a pu mettre en évidence la méthionine en utilisant une chromatographie monodimensionnelle et en révélant le chromatogramme à l'aide du réactif à l'iodoplatinate de potassium, selon la technique de CONSDEN, GORDON et MARTIN [32 bis].
- Que BLASS et RICHARD ont supposé la présence d'acide alpha-amino-pentoïque ou norvaline formé peut-être à partir de la proline par action enzymatique de certaines bactéries du genre *Clostridium*. Pour notre part, nous n'avons pas mis en évidence cette substance.

II. — Etude chromatographique et électrophorétique des molécules peptidiques

Deux échantillons de Nuoc Mam référencés NM 4 et NM 5 ont été analysés par électrophorèse sur papier à pH 5,4 dans le solvant ci-dessous :

— Pyridine	20 ml
— Acide acétique	8 ml
— Eau distillée	2.000 ml

On a séparé ainsi de l'ensemble des acides aminés deux fractions :

- l'une très voisine de la cathode ;
- l'autre voisine de l'anode.

La position de ces fractions, dont la seconde est apparue beaucoup plus importante, a été établie par révélation à la ninhydrine. De plus, on a effectué des dépôts témoins d'une solution d'éthanolamine titrée à 100 mg %. Les valeurs des dépôts ont été de 2, 5, 10 μ g. Les dépôts de la solution d'éthanolamine avaient pour but de confirmer la position exacte des dérivés susceptibles d'être de nature polypeptidique, l'éthanolamine présentant un R_f légèrement inférieur à celui des peptides.

1° Etude de la tache située près de la cathode :

Elle correspond :

- soit à l'acide glutamique ;
- soit au glutathion.

Dans un second temps, on a procédé à une élution aqueuse, suivie d'une hydrolyse de quatre heures en acide chlorhydrique 6 N ; l'hydrolysate a été analysé par électrophorèse dans le tampon pH 1,9 (p. 21). La révélation du tracé électrophorétique a été effectuée à l'aide de ninhydrine. Nous avons ainsi mis en évidence quatre constituants :

— L'acide aspartique	++
— L'acide glutamique	++
— La glycine	+
— La cystéine	+

Ceci laisse supposer la présence de glutathion dans le Nuoc Mam, présence déjà signalée par VIALARD GOUDOU [34].

2° *Etude de la tache située près de l'anode :*

Pour nous assurer de sa nature peptidique, nous avons procédé à son élution à l'aide d'eau distillée, puis à son hydrolyse chlorhydrique (HCl 6 N), selon des modalités identiques à celles utilisées lors de l'étude de la tache située près de la cathode.

L'étude chromatographique sur papier de l'hydrolysate a été effectuée de deux dimensions, selon le schéma ci-dessous :

- première dimension : eau phénol ammoniacque (p. 20) ;
- deuxième dimension : eau butanol acide acétique (p. 20).

La révélation des acides aminés a été faite par la ninhydrine.

Dans ces conditions expérimentales, la tache supposée de nature peptidique a donné par hydrolyse une solution contenant des acides aminés suivants :

- l'éthanolamine ;
- la lysine ;
- l'histidine, arginine ;
- la glycine ;
- la bêta-alanine ;
- l'alpha-alanine ;
- la sérine ;
- la valine ;
- la leucine ;
- l'acide glutamique ;
- la tyrosine ;
- la phénylalanine.

En conclusion, la nature polypeptidique de cette fraction ne fait aucun doute ; il faut noter que ces résultats infirment ceux de BLASS et RICHARD [13], et confirment l'hypothèse de TRUONG VAN CHOM [21].

III. — Etude chromatographique du tryptophane et de ses métabolites

L'étude chromatographique de ces métabolites a été effectuée en utilisant la méthode de J.P. JEPSON [37], soit une chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 1. En première dimension, le solvant est l'isopropanol ammoniacal et, en seconde dimension, le butanol acétique (*fig. 3*).

La lecture du chromatogramme se fait d'une part, par examen en lumière ultra-violette, d'autre part, après révélation par le réactif d'Ehrlich¹.

A) L'examen en lumière ultra-violette (de 250 à 350 nm) permet d'identifier les dérivés métaboliques de la cynurénine et la cynurénine elle-même, qui présentent une fluorescence variant du jaune vert au bleu violet. Ainsi, on peut identifier :

- la cynurénine ;
- l'hydroxycynurénine ;
- l'hydroxycynurénine ortho-sulfate ;
- l'acide cynurénique ;
- l'acétylcynurénine ;
- l'acétylhydroxycynurénine ;
- l'acide anthranilique ;
- l'acide hydroxyanthranilique ;
- l'acide xanthurénique.

B) Exception faite pour l'acide cynurénique et l'acide xanthurénique, le réactif d'Ehrlich fait apparaître l'ensemble des composés précédents et les composés suivants :

- l'indoxylsulfate ;
- l'acide indolylacétique ;
- l'acide indolyl-lactique ;
- l'acétyltryptophane ;
- l'hydroxy-5-tryptophane ;
- le tryptophane ;
- l'acide hydroxy-5-indolylacétique ;
- la tryptamine.

La technique de JEPSON permet également d'identifier la citrulline et l'urée qui donnent une coloration jaune avec le réactif d'Ehrlich.

- (1) — p.diméthyl-aminobenzaldéhyde à 10 % dans HCl concentré (p/v) 1 volume
 — acétone 4 volumes
 Ce réactif ne se conserve pas.

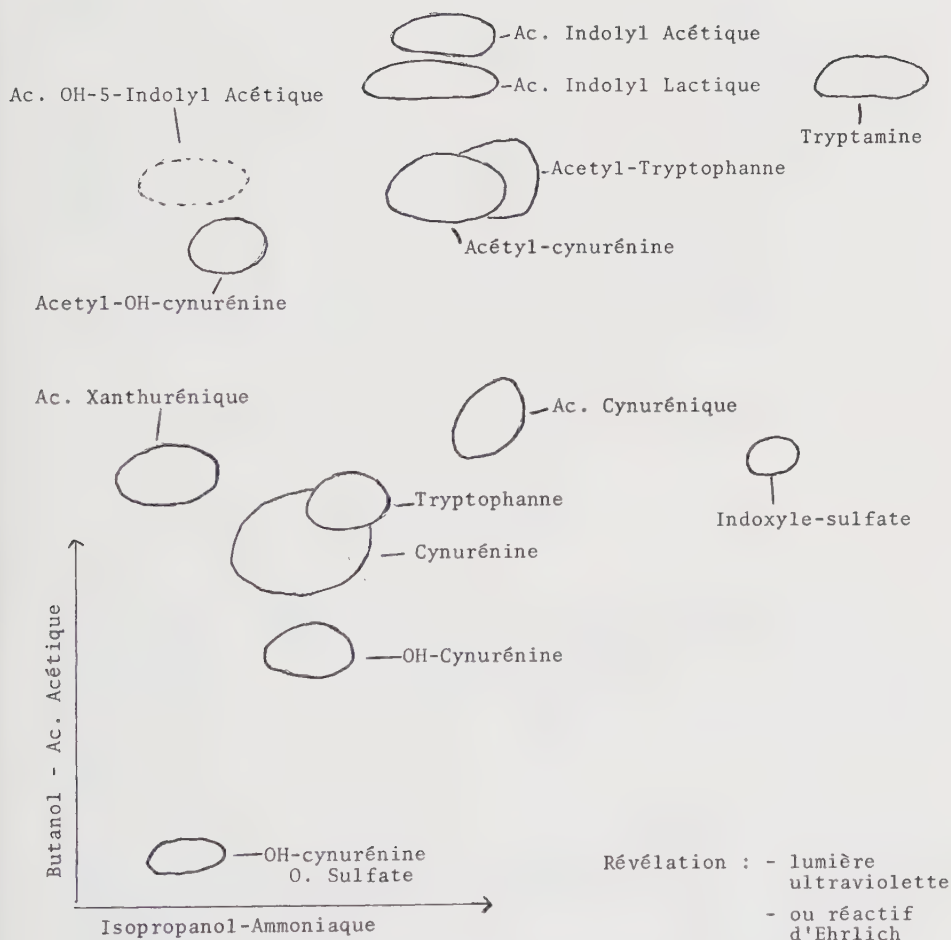


FIGURE 3

*Chromatographie des métabolites du tryptophane
(Méthode de Jepson)*

Nous avons effectué ainsi divers chromatogrammes sur trois échantillons du Nuoc Mam référencés NM 4, NM 5 et NM 7. Les dépôts ont été de 10 à 20 μ /l selon les essais.

Nous avons pu mettre ainsi en évidence :

- le tryptophane, que nous avons dosé selon la technique microbiologique décrite page 125 ;
- la tryptamine ;
- la citrulline.

Au sujet de la citrulline, TRUONG VAN CHOM [21] en fait mention uniquement dans un seul diagramme chromatographique, sans en signaler explicitement sa présence dans le texte. Il faut noter que TRUONG VAN CHOM a révélé la citrulline à l'aide de la ninhydrine, sur une chromatographie bidimensionnelle classique.

Nous n'avons pas constaté la présence d'indole et d'acide bêta-indolacétique que VIALARD GOUDOU a pu doser dans certains échantillons [33].

IV. — Etude chromatographique de l'histamine Son dosage

La présence d'histamine dans le Nuoc Mam a été confirmée par de nombreux auteurs. La plupart des essais effectués sont pharmacologiques [34, 35]. Les taux cités sont relativement variables : de 0,004 g à 1,5 par litre. La majeure partie des taux observés se situe autour de 0,750 g à 6 g par litre.

A) Etude qualitative

Pour notre part, nous avons effectué différents essais pour mettre en évidence l'histamine :

- par électrophorèse à pH 5,4, tension aux bornes de 400 volts et révélation par le réactif de Pauly (p. 21) ;
- par électrophorèse à pH 10, selon la méthode préconisée par A. SARRAF [36] ;
- par chromatographie bidimensionnelle selon la technique de H. GHADIMI [30] et révélation par le réactif de Pauly ;
- par chromatographie bidimensionnelle selon la technique de JEPSON [37] et révélation par le réactif de Pauly (*fig. 4*) ;
- par chromatographie bidimensionnelle selon la technique de AUERBACH [38] et révélation par le réactif de Pauly (*fig. 5*).

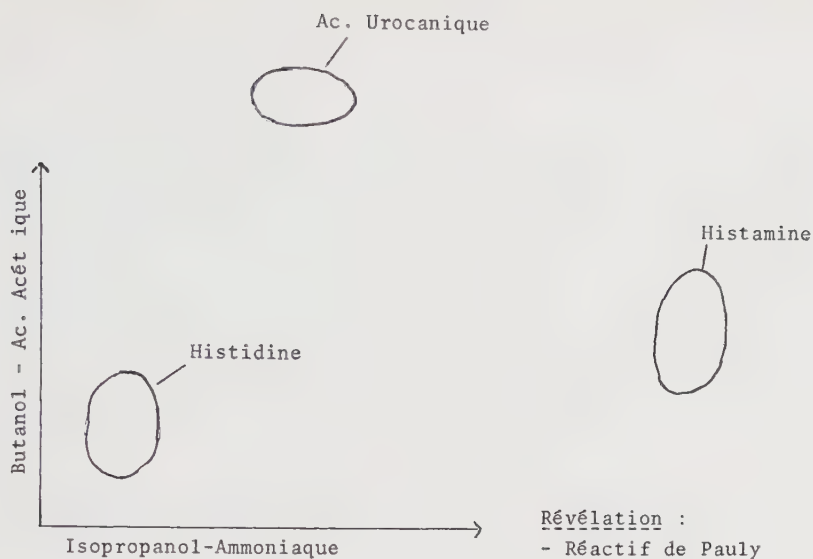


FIGURE 4

*Chromatographie des métabolites de l'histidine
(Système Jepson)*

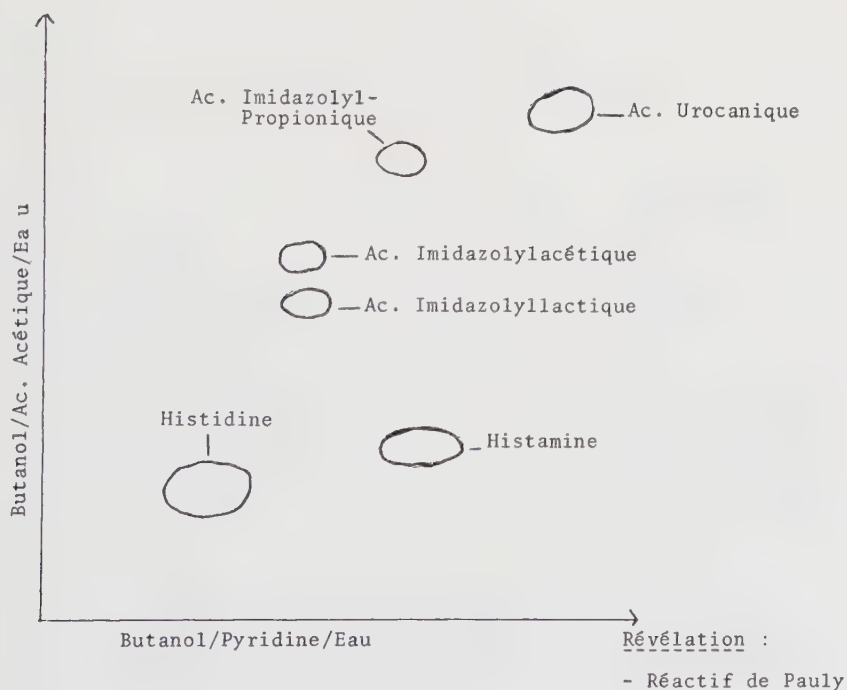


FIGURE 5

*Chromatographie des métabolites de l'histidine
(Système Auerbach)*

Il est intéressant de noter que toutes les méthodes ci-dessus énumérées pour des dépôts variant de 10 à 20 μ /l, ne nous ont pas donné les mêmes résultats. Ceci est peut-être l'explication des divergences que nous avons notées dans les divers travaux effectués à ce sujet.

BLOSS et RICHARD [13], en utilisant une méthode chromatographique monodimensionnelle en collidine et en révélant le chromatogramme par le réactif de Pauly, ont pensé avoir mis en évidence l'histamine, sans toutefois l'affirmer avec certitude. Pour résumer cette question, nous avons établi le tableau suivant, relatif à nos propres résultats :

Référence des échant.	Electrophorèse pH 5,4	Technique de GHADIMI	Technique de JEPSON	Technique de AUERBACH	Technique proposée par SARRAF
N M 4	+	++	++	++	++
N M 5	0	++	++	++	++
N M 7	0	+ ?	0	+ ?	+ ?

Ainsi, les techniques de GHADIMI, de JEPSON, de AUERBACH et de SARRAF nous permettent de répondre par l'affirmative quant à la présence d'histamine dans le Nuoc Mam, du moins dans la grande majorité des cas. Par contre, l'électrophorèse à pH 5,4, pour un même dépôt de Nuoc Mam, ne nous autorise pas à une telle conclusion systématique.

Cependant cette technique peut être utilisée pour la recherche de l'histamine dans un protéolysat. En effet, en l'employant sur un Nuoc Mam dessalé par le procédé électrolytique décrit page 51, nous avons vu apparaître sur le tracé électrophorétique une tache importante correspondant à l'histamine. Cette modification qualitative montre que toute élimination du chlorure de sodium dans un milieu aussi riche en ce sel que le Nuoc Mam, comporte quelques risques quant à l'étude analytique des acides aminés ou de molécules voisines. Cet inconvénient relatif à l'histamine s'ajoute donc à ceux que nous indiquons dans le chapitre consacré à l'élimination du chlorure de sodium (p. 48).

B) Etude quantitative

La très bonne séparation que permettent les méthodes de JEPSON ou d'AUERBACH nous a incité à évaluer la quantité d'histamine présente dans le Nuoc Mam en effectuant l'étalonnage de la méthode

à l'aide de solutions étalons déposées sur des chromatogrammes menés parallèlement à notre essai. Après révélation à l'aide du réactif de Pauly, nous avons procédé à des éluions aqueuses, puis à une évaluation spectrophotométrique selon les modalités décrites page 36.

Dans ces conditions opératoires, la teneur en histamine de trois échantillons de Nuoc Mam a été trouvée égale à :

<i>Référence de l'échantillon</i>	
NM 4	1,250 g par litre
NM 5	0,750 g par litre
NM 7	0,680 g par litre

Il nous a paru intéressant, compte tenu de ces valeurs élevées, d'effectuer sur ces mêmes échantillons l'essai biologique décrit à la Pharmacopée française (8^e édition, p. 1622). Les taux observés ont été nettement inférieurs :

<i>Référence de l'échantillon</i>	
NM 4	0,280 g par litre
NM 5	0,100 g par litre
NM 7	0,120 g par litre

V. — Etude de l'histidine et de ses métabolites

- Les méthodes chromatographiques que nous avons utilisées sont :
- la méthode chromatographie bidimensionnelle de AUERBACH [38] (*fig. 5*);
 - la méthode chromatographie bidimensionnelle de JEPSON [37] (*fig. 4*).

Dans les deux cas, la révélation a été effectuée à l'aide du réactif de Pauly (p. 21).

Nous avons mentionné également ces deux techniques dans l'étude de l'histamine (p. 30) et dans les essais concernant le dosage de l'histidine (p. 39).

Elles nous ont permis d'affirmer la présence d'histidine et d'histamine. Un métabolite important de l'histidine : l'acide urocanique, n'a cependant pas été mis en évidence, bien que les méthodes préconisées permettent de le détecter aisément.

De plus, la présence d'histidine a été infirmée par BLASS et RICHARD [13] et n'a été mise qu'une seule fois en évidence par TRUONG VAN CHOM [21]. Il faut cependant rappeler que les méthodes utilisées par BLASS et RICHARD, et TRUONG VAN CHOM ne sont pas, à notre avis, aussi sensibles que celle de JEPSON.

VI. — Etude chromatographique relative aux acides organiques

Pour la mise en évidence des acides organiques, nous avons utilisé la technique décrite par J. NORDMANN et R. NORDMANN [39] dont le principe est le suivant :

Elimination des sels minéraux par passage sur une résine fortement basique, Dowex 2 utilisée sous sa forme formiate de sodium. Les molécules non ionisées, ainsi que les cations, ne sont pas retenus sur la résine et sont contenus dans l'effluent que l'on rejette. Les acides organiques retenus sont alors élués à l'aide d'acide formique 12 N.

L'éluat après concentration sous vide est chromatographié selon deux dimensions :

La première dimension est réalisée dans le solvant :

— n-butanol	120 ml
— Acide acétique	30 ml
— Eau	50 ml

La seconde dimension est réalisée dans le solvant :

— Ethanol	160 ml
— Ammoniaque	10 ml
— Eau	30 ml

On utilise comme révélateur une solution alcoolique de xylose et d'aniline, dans laquelle est plongé le chromatogramme¹.

Après élimination du méthanol par séchage à la température du laboratoire, le chromatogramme est placé dans une étuve chauffée à 105°-110°C pendant dix minutes. Les acides organiques apparaissent en brun, tandis que le fond du chromatogramme se colore en jaune.

Nous avons pu mettre ainsi en évidence de nombreux acides organiques, mais deux seulement ont pu être identifiés avec certitude : — l'acide pyruvique et l'acide lactique.

(1) Dissoudre 1 g de xylose dans 3 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml d'aniline. Compléter à 100 ml à l'aide de méthanol.

Conclusion

L'étude qualitative concernant la mise en évidence des acides aminés dans le Nuoc Mam nous a permis de considérer la chromatographie électrophorèse comme une très bonne technique de séparation dans un milieu aussi riche en électrolytes.

En utilisant une méthode électrophorétique, nous avons pu affirmer la présence de molécules peptidiques dont la composition en acides aminés a été établie par chromatographie après hydrolyse.

Des essais particuliers aux métabolites relatifs au tryptophane et à l'histidine, en utilisant la méthode chromatographique de JEPSON, nous ont indiqué que le Nuoc Mam semble n'en contenir que très peu. En effet, des très nombreux métabolites relatifs au tryptophane, nous n'avons, en réalité, qu'identifié la tryptamine.

Au sujet des métabolites de l'histidine, seule l'histamine a été mise en évidence, tandis que l'acide urocanique, métabolite très important, n'a pas été révélé par le tracé chromatographique.

Chapitre 3

Déterminations quantitatives de certains acides aminés

Utilisation de techniques physicochimiques

- I) Méthodes chromatographiques, électrophorétiques ou chromato-électrophorétiques
Dosage de l'alpha-alanine, de l'acide aspartique, de l'éthanolamine, de l'acide glutamique, de la glutamine, de la glycine, de l'histidine, de la leucine, de l'isoleucine, de la lysine, de la sérine, de la thréonine et de la valine
- II) Méthodes particulières à la proline, l'hydroxyproline, la phénylalanine et à la tyrosine

* *

Les techniques que nous avons utilisées dans ce but sont divisées en deux grands groupes.

- *Dans le premier groupe s'insèrent les méthodes chromatographiques, électrophorétiques ou chromato-électrophorétiques. Toutes sont basées sur un même principe : dans un premier temps, on procède à la séparation de l'acide aminé par un des procédés ci-dessus indiqués ; dans un second temps, la révélation de l'acide aminé sur le support de migration est effectuée ; dans un troisième temps, on*

élue la tache colorée soit à l'aide d'eau distillée, soit à l'aide d'alcool éthylique à 70°C et on évalue l'intensité de la coloration par spectrophotométrie.

Nous avons utilisé ces méthodes pour évaluer les taux en alpha-alanine, acide aspartique, éthanolamine, acide glutamique, glutamine, glycine, histidine, leucine et isoleucine, lysine, sérine, thréonine, valine. Nous avons particulièrement étudié les teneurs en acide glutamique et en glutamine, compte tenu des interférences possibles de ces deux métabolites dans le dosage microbiologique de la l-méthionine indiqué page 99. Nous nous sommes également intéressé plus particulièrement à l'évaluation des taux en leucine et en histidine, pour des raisons sensiblement identiques. A savoir que le dosage microbiologique de la l-leucine (p. 84) et celui de la l-histidine ne nous ont pas permis d'obtenir des valeurs que laissaient supposer nos essais physico-chimiques.

• Dans le second groupe s'insèrent les méthodes particulières à un acide aminé. Elles concernent essentiellement la proline, l'hydroxyproline, la tyrosine et la phénylalanine.

I. — Méthodes chromatographiques, électrophorétiques et chromato-électrophorétiques

a) *Méthode utilisée pour la détermination de : l'alpha-alanine, l'éthanolamine, la glutamine, la glycine, la lysine, la sérine, la thréonine¹ et la valine :*

La méthode bidimensionnelle par chromato-électrophorèse est celle décrite précédemment au sujet des essais qualitatifs. Les réactifs sont identiques. La teneur des dépôts a varié de 10 à 30 μ /l, selon l'acide aminé envisagé et en fonction d'essais préalables.

Une fois l'acide aminé révélé par la ninhydrine, nous avons procédé à une élution dans de l'alcool éthylique à 70°C sous un volume de 3 à 6 ml selon l'intensité de la tache observée. La coloration de l'éluat est alors évaluée au spectrophotomètre à 575 nm par rapport à une gamme d'étalonnage de l'acide aminé étudié, effectuée dans les mêmes conditions (fig. 7).

En pratique, nous avons utilisé une solution étalon de l'acide aminé titrant 100 mg pour 100 ml d'eau distillée contenant 10 %

(1) Dans le cas précis de la thréonine, la séparation préalable est la chromatographie bidimensionnelle décrite page 20, la chromato-électrophorèse ne permettant pas sa séparation (voir tableau, p. 43).

d'alcool isopropylique. Des dépôts de 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g et 20 μ g ont été effectués sur le chromatogramme.

Les résultats obtenus par cette méthode relative à l'alpha-alanine, l'éthanolamine, la glutamine, la glycine, la lysine, la sérine et la valine sont consignés dans le tableau récapitulatif (p. 43).

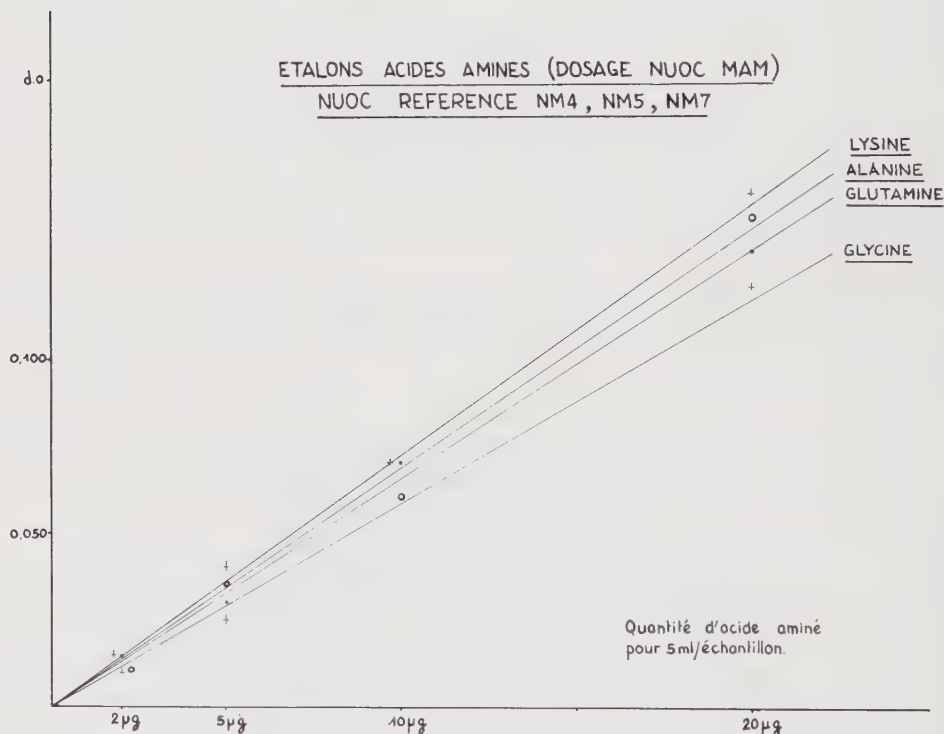


FIGURE 7

b) *Méthode utilisée pour la détermination de l'acide glutamique et l'acide aspartique :*

La méthode est celle de ZALUSKY et HERBERT [40] que nous utilisons quotidiennement pour l'évaluation de l'acide formimino-glutamique dans les urines, lors d'épreuves de surcharge en 1-histidine chez les malades supposés présenter une déficience en acide folique.

Le solvant est un tampon acétique pyridiné de pH 5,4. La tension aux bornes est de 400 volts.

Les autres conditions opératoires, révélation, élution, évaluation et étalonnage spectrophotométriques sont exactement celles décrites dans le paragraphe précédent.

Les résultats obtenus sont également consignés dans le tableau récapitulatif (p. 43).

c) *Méthodes utilisées pour le dosage de l'histidine — présence éventuelle de méthyl-histidine :*

En utilisant la technique chromatographique de JEPSON et celle d'AUERBACH, et la révélation par le réactif de Pauly (p. 21), nous avons corroboré de façon certaine la présence d'histidine dans tous les échantillons de Nuoc Mam mis à notre disposition.

La présence de l'histidine étant ainsi bien établie, nous avons essayé d'en effectuer le dosage physico-chimique selon la méthode décrite ci-dessous, dosage dont l'intérêt est relatif à la possibilité d'évaluer le taux en histidine du Nuoc Mam par la méthode microbiologique que nous proposons.

Pour une évaluation quantitative, on effectue une séparation des acides aminés basiques, dont l'histidine, des autres acides aminés par une chromatographie monodimensionnelle en butanol acétique, la révélation étant faite à l'aide du réactif de Pauly. La tache colorée est alors éluee en milieu aqueux et le dosage est effectué spectrophotométriquement à 575 nm. La méthode est étalonnée par dépôt des solutions étalons d'histidine traitées de façon identique selon le principe indiqué page 36.

En opérant ainsi, nous avons dosé l'histidine dans trois échantillons de Nuoc Mam. Les résultats obtenus sont les suivants :

— Echantillon NM 4	6,67 g %
— Echantillon NM 5	4,40 g %
— Echantillon NM 7	2,10 g %

En comparant ces résultats à ceux obtenus en utilisant la méthode microbiologique décrite p. 81, la méthode physicochimique donne des résultats supérieurs.

— 6,67 g pour 5,8 g
— 4,40 g pour 2,75 g
— 2,10 g pour 0,820 g

Une raison plausible de ces différences systématiques pourrait être la présence éventuelle dans le Nuoc Mam de méthylhistidine.

Nous avons essayé d'étudier le bloc histidine et méthylhistidine que nous avons obtenu lors de la chromatographie précédente. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode proposée par BOULANGER et BISERTE [32] qui consiste à éluer par l'eau l'histidine et la méthyl-

histidine, et d'effectuer sur l'éluat une électrophorèse à pH 6,5 (pyridine, acide acétique et eau distillée) sur papier Whatman n° 1. La révélation des deux acides aminés est ensuite effectuée par la ninhydrine.

Cependant, notre hypothèse ne s'est pas révélée fructueuse, puisque nous n'avons pas mis en évidence de méthylhistidine.

d) Méthodes utilisées pour le dosage de la leucine. L'importance de la présence de l'isoleucine.

Le dosage de la leucine par des procédés chromatographiques a été réalisé selon deux modalités concernant, d'une part le dosage global de la leucine et de l'isoleucine, d'autre part le dosage de la leucine seule.

1) *Dosage global de la leucine et de l'isoleucine* : il a été effectué par chromatographie unidimensionnelle sur papier. Le solvant est le butanol acétique indiqué page 20. Pour la température moyenne de 20°C, la durée de migration a été de trente-six heures. La révélation a été faite par une solution de ninhydrine, l'élution des taches colorées à l'aide d'eau distillée et la lecture spectrophotométrique de l'éluat à 575 nm.

La méthode utilisée est donc la méthode générale exposée page 36. L'étalonnage est effectué à l'aide des solutions étalons traitées de la même manière.

Les résultats obtenus concernent trois échantillons de Nuoc Mam et indiquent une teneur élevée en leucine et isoleucine.

Référence du lot	Teneur en g/mille p/V
N M 4	10,5
N M 5	10,2
N M 7	9,70

Cette méthode couramment utilisée ne permet pas cependant de doser séparément la leucine et l'isoleucine. L'examen du chromatogramme peut à la rigueur, par comparaison planimétrique, laisser préjuger des proportions relatives des deux acides aminés.

En utilisant cette technique, TRUONG VAN CHOM [21] indique un taux moyen de 9 g % (p/v), taux exprimé en leucine sans que l'auteur fasse mention d'isoleucine.

2) En vue d'obtenir des résultats plus spécifiques, c'est-à-dire correspondant au taux réel en leucine, nous avons effectué une double chromatographie dont le principe est le suivant :

Une première dimension, en utilisant comme solvant le butanol acétique, permet comme précédemment le repérage de la leucine et de l'isoleucine en révélant le bloc de deux acides aminés sur un chromatogramme conduit en parallèle. L'emplacement des deux acides aminés étant ainsi délimité, on procède à une élution aqueuse.

L'éluat obtenu est alors chromatographié sur papier, le solvant étant alors une solution de pyridine dans de la méthyléthylacétone aqueuse (15 parties de pyridine pour 70 parties de méthyléthylacétone et 15 parties d'eau distillée). Le chromatogramme étant séché, on procède à la révélation des deux acides aminés par la ninhydrine et les taches colorées sont éluées par de l'eau distillée, tandis que l'on procède ultérieurement à une évaluation spectrophotométrique.

Bien que l'étalonnage de la méthode ait été effectué dans des conditions strictement identiques avec des solutions pures de leucine et d'isoleucine, il nous semble que les résultats obtenus soient sujets à caution, compte tenu des difficultés techniques rencontrées. Néanmoins, les taux suivants en leucine ont été trouvés :

Référence de l'échantillon	Concentration en g/l
N M 4	6,10
N M 5	5,65
N M 7	5,90

En réalité, seule la méthode de MOORE et STEIN [45] permettrait de résoudre ce problème, puisque la méthode microbiologique spécifique que nous préconisons page 84, ne nous a pas permis d'obtenir des résultats plus valables pour des raisons explicitées au chapitre relatif au dosage microbiologique de la l-leucine (p. 84), compte tenu de la présence certaine d'isoleucine dans le Nuoc Mam.

Ayant effectué un essai sur un Nuoc Mam dessalé en utilisant la méthode de MOORE et STEIN, nous avons pu nous rendre compte de la présence simultanée d'isoleucine et de leucine, dans un rapport leucine/isoleucine voisin de 1,2. Bien que la teneur en isoleucine et leucine de ce produit dessalé ne correspondît pas à la réalité, il faut noter que le rapport observé n'est pas très différent de celui que nous avons obtenu lors de notre essai physico-chimique.

II. — Méthodes particulières à un acide aminé

Ces méthodes concernent essentiellement :

- la proline ;
- l'hydroxyproline ;
- la tyrosine ;
- la phénylalanine.

Les techniques relatives à la phénylalanine sont décrites dans le chapitre relatif à l'étude du dosage microbiologique de cet acide aminé page 120.

a) Dosage de la proline :

Nous avons utilisé la technique de TROLL et de LINDSLEY [41]. La proline est dosée colorimétriquement après réaction avec la ninhydrine, à 520 nm. Les acides aminés pouvant interférer la lysine et l'ornithine sont éliminés par passage sur permutite.

b) Dosage de l'hydroxyproline :

Nous avons utilisé la technique de BORELL et coll. [41 bis]. L'hydroxyproline est dosée colorimétriquement après réaction avec la para-diméthyl-amino-benzaldéhyde, l'acide aminé ayant été isolé par entraînement à la vapeur d'eau en présence de carbonate disodique et d'acide glutamique. La coloration est lue à 550 nm.

c) Dosage de la tyrosine :

Nous avons utilisé la technique de LA DU et coll. [42, 183], et la technique de WAALKES et UNDEFRIED [43].

La première technique a pour principe la transformation de la tyrosine en acide alpha-cétonique correspondant par l'action de l'amino-oxydase de venin de crotale. L'acide alpha-cétonique est ensuite dosé spectrophotométriquement après formation d'un complexe enolborique.

La seconde technique consiste à faire agir le nitroso-naphtol en présence d'acide nitrique et de nitrite. Le produit de condensation prend alors une fluorescence spécifique après activation à 460 nm. La lecture de la fluorescence se fait à 570 nm.

Les résultats obtenus, y compris ceux correspondant à la phénylalanine, sont consignés dans le tableau récapitulatif ci-après.

Certains des résultats obtenus peuvent être comparés avec ceux de BLASS et RICHARD [13], et ceux de TRUONG VAN CHOM [21].

Dans leur ensemble, ils concordent davantage avec ceux de TRUONG VAN CHOM, mais il faut noter que BLASS et RICHARD ont travaillé sur un échantillon, à notre avis, pauvre en azote total (12,4 g %) ¹ et qu'ils ont systématiquement utilisé un procédé d'évaluation planimétrique selon la méthode de POLSON [44].

TABLEAU III
Tableau récapitulatif

- Essais quantitatifs relatifs aux acides aminés
- Méthodes physico-chimiques
- Taux exprimés en gramme p. mille

	Références bibliographiques	Echantillon NM 4	Echantillon NM 5	Echantillon NM 7
Acide aspartique	40	8,1	7,2	6,10
Acide glutamique	40	11,6	9,6	9,14
Alpha-alanine (1)		12,5	9,5	6,15
Ethanolamine (1)		indosable	indosable	indosable
Glycine (1)		6,75	5	7,10
Glutamine (1)		8	6,5	8
Histidine (2)		6,67	4,40	2,10
Hydroxyproline	41 bis	0,025	0,015	0,032
Leucine et isoleucine (3)		10,5	10,2	9,70
Lysine (1)		7,20	3,5	3,15
Phénylalanine	184	2,64	2,74	2,70
Proline	41	6,75	4,40	5,12
Sérine (1)		12,40	8,70	4,90
Thréonine (4)		5,25	3,0	3,15
Tyrosine (x)	43	1,61	1,42	1,10
Valine (1)		15,10	10,5	12,40

(1) Par chromat électrophorèse (page 37)

(2) Par chromatographie monodimensionnelle (page 39)

(3) Par chromatographie monodimensionnelle (page 40).

(4) Par chromatographie bidimensionnelle (page 37)

(*) La méthode enzymatique nous a donné des valeurs inférieures à 1 gramme (de l'ordre de 0,980 g) (page 42)

(1) Légalement, le taux en azote total doit être de 15 g % (arrêté du 17 novembre 1943 du Gouverneur Général de l'Indochine).

Conclusion

L'étude quantitative de la plupart des acides aminés a été réalisée en utilisant des méthodes classiques, comme la séparation chromatographique ou électrophorétique, suivie d'une colorimétrie après réaction à la ninhydrine.

Basée sur ce principe, la méthode électrophorétique récente de ZALUSKY et HERBERT nous a permis de préciser une teneur élevée du Nuoc Mam en acide glutamique, tandis qu'une chromatographie bidimensionnelle suivie d'une élution nous confirmait également un taux important en glutamine. L'évaluation quantitative de l'acide glutamique et de la glutamine nous a particulièrement intéressé, du fait d'une interférence possible de ces deux substances lors du dosage microbiologique de la 1-méthionine.

Il nous a été impossible de déterminer, par les méthodes physico-chimiques exposées dans ce chapitre, la teneur en tryptophane que nous avons par contre facilement dosé par la méthode microbiologique que nous préconisons.

Nous avons utilisé, pour le dosage de la phénylalanine et de la tyrosine, deux techniques fluorimétriques récentes : celle de WAALKES et UENDENFRIEND pour la tyrosine, et celle de CAMAN et ROBINS pour la phénylalanine.

La détermination de la phénylalanine nous a permis de comparer les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par la méthode microbiologique basée sur le principe de l'utilisation des inhibiteurs.

Dans un autre ordre d'idée, nous nous sommes efforcé de doser spécifiquement la leucine en effectuant une séparation chromatographique de la leucine et de l'isoleucine.

Ceci avait pour but non seulement de mettre en évidence l'isoleucine, mais également de nous rendre compte de la valeur du rapport leucine/isoleucine, valeur à notre avis légèrement supérieure à 1. Ainsi, devient explicable le fait que la méthode microbiologique préconisée pour la 1-leucine n'est pas envisageable dans le cas du Nuoc Mam.

Au sujet de l'histidine, nous avons essayé de séparer cet acide aminé de la méthylhistidine en pensant que les discordances notables que nous avons obtenues, en utilisant la méthode chromatographique et la méthode microbiologique, pouvaient avoir pour origine la présence de méthylhistidine. Malheureusement, la méthylhistidine n'a pas été décelée, tandis que nous nous sommes assuré plus loin que, même au cas où elle serait présente, elle n'interférerait pas dans la méthode microbiologique selon un processus identique à l'isoleucine vis-à-vis de la leucine.

Enfin, l'examen du tableau récapitulatif (p. 43) montre la richesse en acides aminés du Nuoc Mam.

Chapitre 4

Etude et dosage de diverses substances azotées

- I) Dosage de l'azote total, de l'urée et de la créatinine
- II) Etude des bases puriques

* *

I. — Dosage de l'azote total, de l'urée et de la créatinine

Nous avons effectué les déterminations de l'azote total, de l'urée et de la créatinine pour diverses raisons.

En déterminant :

- l'azote total, nous avons voulu nous assurer que les échantillons mis à notre disposition présentaient un taux en azote total d'au moins 15 g % (p/v), ce taux étant considéré comme un taux minimum légal dans la circulaire du 17 novembre 1943 émanant du Gouverneur Général de l'Indochine et comme souhaitable par VIALLARD GOUDOU. La méthode que nous avons utilisée est celle décrite à la Pharmacopée française (8^e édition, p. 1533);
- en évaluant l'urée par une méthode plus spécifique à l'aide de la réaction avec la diacétylmonoxime adaptée à l'autoanalyseur Technicon [45 bis], nous avons voulu nous rendre compte si cette méthode actuellement très utilisée donnait des résultats très différents des méthodes classiques et à présent le plus souvent abandonnées. Ces méthodes ont pour principe, en général, une

précipitation sous forme de dioxanthylurée titrée ensuite par oxydation sulfochromique comme le préconise TRUONG VAN CHOM [21, 46];

- le dosage de la créatinine a été également entrepris du fait que nous avons nous-même présenté une modification de la méthode de FOLIN et WU [47] au sujet de la créatinine sanguine. Cette méthode spectrophotométrique, basée sur la réaction avec l'acide picrique, nous semble plus certaine que celle préconisée par TRUONG VAN CHOM [21] consistant à la transformer en méthylguanine par oxydation, la méthylguanine étant évaluée par la réaction de Sakaguchi.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-après. Ils sont exprimés en g %.

Référence de l'échantillon	AZOTE TOTAL	UREE	CREATININE
N M 1	30,5	1,80	
N M 2	16,96	2,10	
N M 3	23,--	2,15	
N M 4	24,59	2,10	0,941
N M 5	21,15	2,20	0,970
N M 6	20,--		0,985
N M 7	18,40		0,810

Ainsi, il semble que les échantillons soumis à nos essais présentent un taux en azote total adéquat, tandis que les taux moyens en urée et en créatinine se situent respectivement autour de 2 g et de 0,900 g.

II. — Etude des bases pures

De nombreux auteurs, dont VIALARD GOUDOU, font mention de la présence de bases pures dans le Nuoc Mam [14]. Sans prétendre à une évaluation quantitative, nous avons essayé de mettre en évidence ces bases pures par différentes méthodes :

- dans une première série d'essais, nous avons effectué une électrophorèse à pH 9,2, en tampon boraté de sodium (0,05 M), suivie d'une révélation du tracé électrophorétique par le bleu de bromophénol et le nitrate d'argent dissous dans une solution aqueuse

d'acétone¹. Dans tous les échantillons examinés, nous avons mis en évidence des bases puriques qui se sont révélées en violet, mais nous avons été incapable de les identifier réellement. Exception faite cependant pour l'hypoxanthine qui se révèle en bleu ;

- dans une seconde série d'essais, nous avons tenté de mettre en évidence l'adénine, la guanine et l'hypoxanthine en utilisant la méthode microbiologique proposée page 67. Dans le cas des deux premières bases puriques, l'inhibiteur introduit dans le milieu de culture était le sulfate de l'aza-8-diamino 2-6 purine [48]. Dans le cas de l'hypoxanthine, nous avons utilisé comme analogue l'hydroxy-triazolo-pyrimidine [49].

Aucun des résultats obtenus ne nous a permis de conclure, en utilisant cette méthode microbiologique, à la présence de ces trois bases puriques.

- (1) — Bleu de bromophénol à 0,4 % dans l'acétone 1 volume
— Nitrate d'argent à 2 g % dans l'eau distillée 1 volume

Chapitre 5

Elimination éventuelle du chlorure de sodium

- I) Utilisation de techniques basées sur l'insolubilité du chlorure de sodium dans un solvant organique
- II) Utilisation d'une technique par dialyse
- III) Utilisation d'un appareil à cathode de mercure (dessalage électrolytique)

* *

L'élimination du chlorure de sodium avait pour but l'utilisation de la méthode de MOORE et STEIN pour la détermination du taux en différents acides aminés du Nuoc Mam [51, 52, 53, 54]. Nous avons ainsi envisagé de contrôler les résultats que nous avons obtenus par la méthode microbiologique que nous préconisons. Dans la méthode de MOORE et STEIN automatisée, l'élimination des éléments minéraux est réalisée par passage préalable des solutions sur différents types de résines dont les chromobed A ou B¹ et les résines sphoenix phoenix². Une condition cependant doit être respectée. Elle est relative à une teneur en électrolytes des solutions à analyser, teneur qui doit être relativement faible. Cette précaution n'étant pas prise, on risque en effet de saturer les résines et de les rendre définitivement inutilisables, alors qu'elles sont d'un coût très élevé. Nous étant documenté à ce sujet, nous avons estimé qu'il était risqué d'analyser des solutions dont la teneur en chlore serait supérieure à 400 mEq/l. La

(1) Fournisseur Technicon.

(2) Fournisseur Techmation.

plupart des échantillons de Nuoc Mam soumis à nos essais titraient plus de 4.000 mEq de chlore par litre. Il fallait donc réaliser une élimination préalable des électrolytes et estimer la valeur de cette élimination en dosant dans les solutions dessalées non seulement le chlorure de sodium, mais également l'azote total et plusieurs acides aminés, l'élimination d'une quantité aussi importante d'électrolytes risquant d'entraîner des pertes sensibles en acides aminés. Quelle que soit la validité de la méthode microbiologique que nous proposons, elle pouvait cependant nous servir de méthode utilisée à titre comparatif pour l'évaluation de certains acides aminés avant et après le dessalage. Nous l'avons donc utilisée en même temps, le cas échéant, que d'autres techniques physico-chimiques.

Nous avons envisagé l'élimination du chlorure de sodium selon quatre modalités :

- par la méthode préconisée par BLASS et RICHARD [13]. Les auteurs utilisent l'acétone contenant 1 % d'acide chlorhydrique. La solution acétonique acide est alors évaporée sous vide et le résidu repris par de l'eau distillée ;
- par la méthode décrite par TRUONG VAN CHOM [21] utilisant l'alcool éthylique chlorhydrique. L'alcool et l'acide chlorhydrique sont dans un second temps éliminés par évaporation sous vide et le résidu final repris par de l'eau distillée ;
- par dialyse en boyau de cellophane ;
- à l'aide de l'appareil Shandon, à cathode de mercure.

1) *Méthode préconisée par Blass et Richard :*

Les essais ont été effectués sur un échantillon de Nuoc Mam référencé NM 4. La méthode nous a permis d'éliminer une grande partie du chlorure de sodium, sans toutefois obtenir des taux satisfaisants, c'est-à-dire relativement faibles. Nous avons dosé la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane par la méthode microbiologique et avons effectué une chromatographie électrophorèse sur le soluté dessalé. L'ensemble des résultats sont consignés ci-après (Tableau IV).

2) *Méthode préconisée par Truong van Chom :*

Elle s'est avérée très inférieure à celle de BLASS et RICHARD. Nous avons éprouvé des difficultés très importantes quant à l'élimination de l'alcool et de l'acide chlorhydrique.

3) *Essais de dialyse en boyau* ¹ *Nojax effectués contre de l'eau distillée :*

Les volumes de Nuoc Mam soumis à la dialyse ont toujours été de 15 ml. Dans les séries d'essais, seuls les temps de dialyse ont changé.

Nous avons effectué, dans le liquide dialysé, les dosages suivants :

- teneur en chlorures (exprimée en chlore);
- teneur en azote total ;
- teneur en 1-phénylalanine.

Les résultats sont exprimés en grammes pour les chlorures et l'azote total, et en mg pour la phénylalanine, et correspondent à la totalité du liquide ayant subi la dialyse (*Tableau V*).

Les résultats relatifs à la méthode de BLASS et RICHARD et à l'utilisation des boyaux cellulosiques sont :

TABLEAU IV
*Résultats obtenus par la méthode préconisée
par Blass et Richard*

	Avant dessalage	Après dessalage
Taux en CHLORE en mEq p. mille	4800	1700
Taux en SODIUM en mEq p. mille	4600	800
Taux en PHENYLALANINE en g p. mille		
par fluorimétrie	2,64	2,70
par bactériologie	2,32	2,24
Etude CHROMATO- ELECTROPHORETIQUE	image inchangée	
Taux en METHIONINE en g p. mille par bactériologie	3,10	2,94
Taux en TRYPTOPHANE en g p. mille	0,144	nul

Ainsi la méthode préconisée par BLASS et RICHARD permet une élimination importante mais non suffisante, à notre avis, du chlorure de sodium pour que l'on ait pu envisager des contrôles par la méthode de MOORE et STEIN.

(1) Viscora, 55, rue de la Boétie, Paris-8^e.

Du point de vue de la teneur en acides aminés, elle peut être jugée comme très satisfaisante, exception faite pour le tryptophane, ceci en raison du traitement du Nuoc Mam en milieu acide.

TABLEAU V
Résultats obtenus par dialyse en boyau cellulosique Nojax

Temps de Dialyse	Volume initial	Volume final	AZOTE dans l'échantillon en g		CHLORE dans l'échantillon en mEq		l-PHENYLALANINE dans l'échantillon en mg	
			Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse
1 heure	15 ml	27 ml	0,369	0,215	63,75	18,36	34,80	6,75
2 heures	15 ml	35 ml	0,369	0,176	63,75	9,66	34,80	8,40
4 heures	15 ml	37 ml	0,369	0,102	63,75	2,59	34,80	indosable
6 heures	15 ml	35 ml	0,369	0,066	63,75	1,785	34,80	indosable
24 heures (+)	15 ml	49 ml	0,317	0,198	63,75	2,425	31,50	indosable
48 heures	15 ml	44 ml	0,369	0,079	63,75	0,176	34,80	indosable

Cette méthode, si elle permet une très bonne élimination du chlorure de sodium en quatre heures, ne peut cependant être retenue du fait que les substances azotées dont la l-phénylalanine sont également éliminées.

4) *Elimination du chlorure de sodium par utilisation de l'appareil Shandon, référence Mark 3, à cathode de mercure :*

La teneur très élevée en chlorure de sodium du Nuoc Mam n'a pas permis d'effectuer le dessalage sur le produit pur. Les essais ont été effectués sur un produit dilué au 1/10^e à l'aide d'eau distillée. Cette méthode présente, sur la précédente, l'avantage certain d'obtenir un liquide présentant une très faible teneur en chlorure de sodium, comme l'indique le tableau ci-après.

Cette méthode cependant ne donne pas entière satisfaction. En effet, une partie des produits azotés a été éliminée, fait corroboré par le dosage de l'azote total et par l'image chromatographique qui a présenté au niveau de la phénylalanine une légère diminution d'intensité.

(*) Echantillon différent de celui choisi dans les autres essais.

Un phénomène très intéressant mérite d'être noté. En procédant aux dosages microbiologiques de la 1-phénylalanine et de la 1-méthionine, nous avons constaté autour des disques une zone de bactériostase très nette, la croissance bactérienne n'apparaissant qu'au-delà de cette zone. Cette bactériostase est due à la présence de sels de mercure. Elle est en tout point comparable à celle que l'on observe lors du dosage des antiseptiques comme le nitrate de phénylmercure dans les solutés médicamenteux [50].

Teneur en AZOTE en g pour mille		Teneur en CHLORE en mEq pour mille		Image Chromato- Electrophorétique (Bidimensionnelle)	Teneur en PHENYLALANINE Méthode microbiologique en g. p.mille	
Avant dessalage	Après dessalage	Avant dessalage	Après dessalage	Après dessalage	Avant dessalage	Après dessalage
24,59	22	4800	10	Diminution de l'intensité de la tache de phénylalanine	2,32	ininter- prétable

Nous avons pu mettre en évidence que cette zone de bactériostase est d'autant plus intense que le temps de passage du Nuoc Mam dans le dessaleur Shandon était plus grand.

Temps	Cas du dosage de la 1-phénylalanine (+)	Cas du dosage de la 1-méthionine (+)
Passage d'une heure	16 mm	18 mm
Passage de deux heures	21 mm	22 mm

(+) Pour des disques de 9 mm de diamètre.

Cependant, les dosages des deux acides aminés furent réalisables en évaluant le diamètre extérieur des zones circulaires correspondant à une croissance bactérienne. En effet, nous avons procédé à des essais d'étalonnage en présence de nitrate de phénylmercure. Les taux de nitrate de phénylmercure ont été de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ et de 0,20 $\mu\text{g/ml}$. A ces taux, en effectuant l'évaluation des diamètres extérieurs des zones de croissances, sans se préoccuper de la zone bactériostatique inférieure, les valeurs trouvées diffèrent peu des valeurs théoriques.

A) 1-phénylalanine :

Teneur théorique de la solution	Diamètre de croissance bactérienne (+)	Diamètre de la zone bactériostatique (+)
- 20 µg/ml en 1-phénylalanine	34 mm	
- 20 µg/ml en 1-phénylalanine en présence de 0,50 µg/ml de nitrate de phénylmercure	33,5 mm	25 mm
- 20 µg/ml en 1-phénylalanine en présence de 0,20 µg/ml de nitrate de phénylmercure	33,5 mm	20 mm
(+) Pour les disques de 9 mm et pour les solutions titrant 4 mg p. cent pour la méthionine et 2 mg. p. cent pour la phénylalanine.		

B) 1-méthionine :

Teneur théorique de la solution	Teneur trouvée	Diamètre de croissance bactérienne	Diamètre de la zone de bactériostase
40 µg/ml en 1-méthionine	40 µg/ml	31 mm	
40 µg/ml en 1-méthionine en présence de 0,50 µg/ml de nitrate de phénylmercure	40 µg/ml	31 mm	22 mm
40 µg/ml en 1-méthionine en présence de 0,20 µg/ml de nitrate de phénylmercure	41 µg/ml	31,5 mm	19 mm

Bien qu'il soit difficile d'admettre un tel procédé de dosage microbiologique, les résultats précédents laissent supposer que pour une certaine valeur du rapport teneur en acide aminé/teneur en sel organique de mercure, il n'est pas impossible d'obtenir des résultats quantitatifs.

A titre indicatif, nous avons déterminé le taux critique en sel organique de mercure susceptible d'inhiber toute croissance bactérienne lors de nos essais correspondant aux dosages microbiologiques

de la 1-phénylalanine et de la 1-méthionine. Ce taux se situe autour de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, taux exprimé en nitrate de phénylmercure, puisqu'il nous était impossible de préciser la composition exacte du dérivé mercuriel formé lors de l'électrolyse.

Si nous avons insisté sur ce point, ce n'est pas du tout pour essayer de pallier ce phénomène, mais pour mettre en garde lors de l'emploi de certains dessaleurs basés sur le même principe. L'emploi d'une méthode de dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé nous a donc permis accidentellement de mettre en évidence un phénomène que les très nombreuses méthodes microbiologiques réalisées en milieu liquide risquent de ne pas signaler.

Enfin, en ajoutant à la solution dessalée des quantités croissantes de sel disodique de l'acide éthylène-diamino-tétracétique (de 10 à 50 $\mu\text{g/ml}$), l'interférence du dérivé mercuriel n'a pu être évitée.

En conclusion, des quatre procédés de dessalage, aucun ne nous a donné satisfaction au sujet du Nuoc Mam :

- la méthode préconisée par BLASS et RICHARD élimine incomplètement le chlorure de sodium ;
- la méthode décrite par TRUONG VAN CHOM est difficile à réaliser ;
- la dialyse en boyau cellulosique est inapplicable ;
- enfin, la méthode par électrolyse à cathode de mercure introduit dans la solution des dérivés mercuriels dont les activités bactériostatiques risquent d'interférer lors des dosages microbiologiques des acides aminés.

Chapitre 6

Généralités concernant l'emploi éventuel d'un analogue de structure d'un acide l-aminé en vue du dosage microbiologique de cet acide aminé

- I) Rappel des méthodes classiques : méthode physico-chimique de MOORE et STEIN et dosages microbiologiques utilisant une bactérie dépendante d'un acide l-aminé
- II) Etude des principaux analogues de structure susceptibles d'être employés dans la méthode générale proposée faisant appel à une inhibition préalable d'une croissance bactérienne

* *

I. — Rappel des méthodes classiques

1) *La méthode physico-chimique de référence :*

Une technique idéale pour le dosage des acides aminés dans un protéolysat est sans aucun doute la méthode de MOORE et STEIN que l'on a pu automatiser [45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57].

Cette méthode consiste à fixer les acides aminés sur une résine échangeuse d'ions, puis à procéder à une élution automatique par

passage d'une solution dont le pH varie graduellement. L'élution est donc continue et les fractions successives correspondent chacune à un acide aminé déterminé que l'on évalue colorimétriquement, le plus souvent, après réaction avec la ninhydrine.

Malheureusement, dans le cas qui nous intéresse, cette technique ne peut être utilisée que si l'on procède à l'élimination presque totale du chlorure de sodium dans le Nuoc Mam.

Cette élimination que nous avons étudiée (p. 48) se montre délicate, car la concentration en chlorure de sodium du Nuoc Mam est telle que les procédés de dessalage ont le grave inconvénient d'éliminer en même temps une forte proportion d'acides aminés. Nous nous sommes explicité sur ce point dans le chapitre précédent.

2) Les méthodes microbiologiques classiques :

Nous avons été amené à envisager des méthodes différentes pour lesquelles la teneur élevée en électrolytes n'intervient pas. Parmi ces méthodes, figurent celles décrites dans le chapitre III. Ce sont des techniques physico-chimiques. Parallèlement à ces méthodes, nous pouvions utiliser des méthodes biologiques utilisant les lactobacilli et les streptococci, bactéries dont la croissance dépend d'un acide aminé. Au préalable, on a fixé les conditions expérimentales relatives en particulier à la composition du milieu de culture d'essai. Nous n'avons utilisé qu'une seule fois ce procédé faisant appel à une souche dépendante de l'acide aminé ou d'une vitamine. Il s'agit de l'évaluation de l'acide pantothénique (p. 138).

Le plus souvent, les bactéries dépendant d'un acide aminé appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* :

- *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014¹ ;
- *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042² ;
- *Streptococcus faecalis* ATCC 8043³ ;
- *Streptococcus faecalis* ATCC 6057⁴.

Exception faite pour *Streptococcus faecalis* ATCC 6057 [113], la croissance bactérienne est suivie en milieu liquide. On procède à l'évaluation soit du trouble observé, soit de l'acidité apparue, trouble et acidité étant fonction de la croissance bactérienne.

(1) Acide pantothénique, tryptophane.

(2) Acide aspartique, acide glutamique, glyocolle, arginine, lysine, méthionine, proline, phénylalanine, sérine, tyrosine, valine, leucine, isoleucine.

(3) Acide folique, leucine, isoleucine, thréonine, valine.

(4) Lysine.

Ces techniques à présent classiques [149, 150, 151, 152, 153] ont pour intérêt d'être spécifiques, de ne doser que la forme 1 de l'acide aminé et d'être utilisables pour évaluer des quantités très faibles d'un acide aminé (de l'ordre du millimicrogramme). Cependant, lors de leur emploi, quelques inconvénients ne peuvent être considérés comme mineurs. Ce sont des méthodes longues et délicates à exécuter. Les souches bactériennes dépendantes exigent un entretien précis, relatif au milieu de conservation et aux temps de repiquage successifs, faute de quoi elles deviennent inutilisables. Enfin, les milieux de culture exigés pour ces essais sont difficiles à préparer, compte tenu d'une composition complexe où figurent le plus souvent l'ensemble des acides aminés essentiels autres que l'acide aminé à doser, des bases puriques, des vitamines du complexe B¹.

Pour ces raisons, nous avons préféré étudier des dosages microbiologiques basés sur un tout autre principe, nous inspirant pour cela d'une part de l'épreuve semi-quantitative de R. GUTHRIE [58, 59, 60] en vue du dépistage systématique des taux sanguins en 1-phénylalanine anormalement élevés, d'autre part de la mention particulière faite par G.R. SHOCKMAN dans *Analytical Microbiology*, publié sous la direction de KAVANAGH [61], estimant que la technique de R. GUTHRIE pour la 1-phénylalanine ouvre peut-être la voie sur une série de techniques microbiologiques non négligeables.

Le principe général de la méthode que nous avons ainsi essayée d'établir en vue du dosage de certains acides aminés dans le Nuoc Mam peut être résumé ainsi :

L'inhibition de croissance d'un germe provoquée par un analogue de structure d'un acide aminé peut être levée par addition au milieu de culture de l'acide aminé. Pratiquement, l'inhibiteur est incorporé au milieu de culture gélosé, tandis que l'addition de l'acide aminé est réalisable à l'aide de disques ou de cylindres. C'est donc une méthode par diffusion, la croissance bactérienne autour du disque ou du cylindre étant d'autant plus intense que la quantité d'acide aminé présente est plus grande.

Ce principe général étant admis, et pour éviter les inconvénients précités au sujet des méthodes classiques, il s'agissait pour nous de ne faire varier que le minimum d'éléments, en réalité pour un même milieu de culture d'essai et pour une même souche bactérienne, un élément fondamental représenté par l'inhibiteur, analogue de structure de l'acide aminé que l'on veut doser. Ceci suppose donc le choix d'un inhibiteur spécifique une fois la méthode générale admise.

(1) Tous ces milieux sont commercialisés (B.D. Mérieux, Difco, Oxoid...).

II. — Les inhibiteurs analogues des acides aminés

Les inhibiteurs que nous avons étudiés sont des antimétabolites analogues des acides aminés bloquant partiellement ou totalement le métabolisme normal de la bactérie.

1) *Les analogues de structure des acides aminés pouvant être des inhibiteurs de la croissance d'une ou de plusieurs bactéries :*

En règle générale, l'antimétabolite est obtenu par des modifications relativement simples au niveau d'un ou des atomes de l'acide aminé. La dimension de la molécule obtenue et son ionisation ne sont pas très différentes de celles de l'acide aminé. Le plus souvent, le remplacement d'un atome de carbone par un atome de soufre, d'azote ou d'oxygène suffit. Quelquefois, les modifications apportées à la molécule d'acide aminé sont plus importantes : remplacement d'un système cyclique par un autre système cyclique, passage à l'homologue supérieur ou inférieur, halogénéation soit au niveau d'un cycle, soit au niveau d'une chaîne latérale. Nous avons résumé les principales modifications apportées aux acides aminés en nous inspirant des travaux de RICHMOND [62] et de MEISTER [63] (Tableau VI).

TABLEAU VI

Nouvel - Atome - Radical - Cycle	Remplaçant le - Radical - Cycle - Atome	Inhibiteur antagoniste	Acide aminé (ou base purique)
FLUOR	hydrogène	Fluoro-phénylalanine	Phénylalanine
SOUFRE	CH ₂	Amino-éthyl-2-cystéine	Lysine
SELENIUM	soufre	Séléno-méthionine	Méthionine
CH ₂ en plus		(éthionine homo-arginine	(méthionine arginine
NH ₂	OH	p. amino-phénylalanine	Tyrosine
N	C-H	(azalysine azatryptophane aza-4-leucine triazole-1.2.4.-alanine ou azahistidine aza-8-diamino-2.6.-purine	Lysine Tryptophane Leucine Histidine Purine
CH ₃	H	Méthyl 4 ou 5 ou 6 tryptophane Méthyl-leucine	Tryptophane Leucine
THIENYL	Phényl	Thiényl-2-alanine	Phénylalanine
FURYL	Phényl	Furyl-2-alanine	Phénylalanine
CH ₃ -S ^O ₂ -NH	CH ₃ -S-	l-méthionine dl sulfoximine	(méthionine acide glutamique glutamine

Un point mérite d'être souligné, c'est le fait qu'un inhibiteur analogue n'est pas obligatoirement une molécule synthétisée. En effet, la glycine, la sérine, la thréonine, la bêta-alanine peuvent inhiber la croissance de *Streptococcus faecalis*. Pour notre part, nous avons observé ce phénomène avec l'isoleucine, analogue de la leucine, et ceci nous a gêné pour mettre au point le dosage microbiologique de la 1-leucine, comme il est indiqué page 88. On peut dire que tout acide aminé naturel peut être un inhibiteur de la croissance d'une bactérie.

Nous avons songé à utiliser également les dérivés des amino-acides comme analogues inhibiteurs. La plupart des résultats relatifs à la croissance des bactéries indiquent un échec. Nous avons relevé cependant que la d-leucine s'oppose à l'utilisation de la leucine par *Lactobacillus arabinosus* [67].

Signalons également que les travaux que nous avons consultés concernant les analogues structuraux inhibiteurs, indiquent que les buts poursuivis sont, dans la majorité des cas, la mise en évidence de propriétés antitumorales et la mise en évidence de propriétés antibactériennes.

2) *Mode d'action des analogues des acides aminés en tant qu'inhibiteurs de la croissance bactérienne :*

Le mode d'action des inhibiteurs est à l'heure actuelle très mal connu. La plupart des essais ont été effectués en utilisant comme bactéries sensibles *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides*, bactéries dont on connaît assez bien les besoins en acides aminés.

Les effets des inhibiteurs analogues sur la croissance bactérienne sont assez différents d'une expérience à l'autre. Par exemple, la thiényl-2-bêta-alanine et le méthyl-5-tryptophane provoquent, ajoutés à une culture d'*Escherichia coli* en croissance exponentielle, l'apparition d'une croissance presque linéaire [62], tandis que la para-fluoro-alanine inhibe totalement une culture de *Bacillus cereus* [72, 178, 179]. Quelquefois, la croissance bactérienne demeure exponentielle, mais son intensité est fortement diminuée, comme c'est le cas pour l'aza-7-tryptophane ajouté à une culture d'*Escherichia coli* [88].

Quant aux mécanismes exacts de l'inhibition, il semble que l'on puisse en distinguer quatre grands groupes :

— la synthèse des protéines n'est pas arrêtée. Elle est modifiée dans ce sens que les protéines élaborées sont différentes, puisqu'elles possèdent l'analogue de l'acide aminé. Dans ce cas, l'analogue subit les mêmes processus enzymatiques que l'acide aminé. Ceci a été remarqué pour la fluoro-phénylalanine et la phénylalanine

[64]. On assiste alors rapidement soit à une réduction, soit à un arrêt de la synthèse des protéines ;

- la synthèse des protéines n'est pas arrêtée, mais les protéines une fois élaborées vont modifier les étapes enzymatiques, ce qui aura pour conséquence, en second lieu, une altération plus profonde dans la synthèse des protéines ;
- l'analogue de l'acide aminé remplace l'acide aminé d'un système enzymatique nécessaire soit à la biosynthèse, soit à la dégradation des protéines. Ainsi l'éthionine est incorporée dans l'alpha-amylase de *Bacillus subtilis* [65, 66] ;
- l'inhibition est provoquée par le simple fait que l'analogue s'oppose à la synthèse de l'acide aminé par la bactérie.

Ainsi le méthyl-5-tryptophane, en s'opposant à l'activité enzymatique nécessaire à la formation d'acide anthranilique à partir de l'acide glutamique et de l'acide sikiminique, ne permet plus la synthèse de l'indole par la bactérie [197].

D'autres exemples peuvent être énumérés. Certains d'entre eux ont été décrits dans les chapitres concernant les acides aminés que nous avons dosés par la méthode microbiologique que nous proposons.

3) *La levée de l'inhibition de la croissance bactérienne :*

L'inhibition de la croissance d'une bactérie par un analogue d'un acide aminé peut présenter un caractère fondamental : celui d'être empêché par addition dans le milieu de culture de l'acide aminé. Ainsi une culture d'*Escherichia coli* ou de *Staphylococcus aureus* inhibée par la dl-méthoximine présente de nouveau une croissance positive par addition au milieu de culture de l-méthionine [49]. De nombreux autres exemples peuvent être cités, comme l'indique le tableau ci-après.

Cet antagonisme entre un acide aminé et son analogue structural quant à la croissance bactérienne, peut être pris dans un sens large et, dans ce cas, il paraît justifié de faire un certain rapprochement avec l'antagonisme décrit entre certains acides aminés et certains antibiotiques, en particulier celui de la l-phénylalanine et le chloramphénicol [68]. La phénylalanine permet, ajoutée à une culture bactérienne stoppée par le chloramphénicol, la réapparition de la croissance. Il semble cependant que le mécanisme de la réversibilité est quelque peu différent.

Les principaux antagonismes que nous avons notés à titre d'exemple sont consignés dans le tableau ci-après (*Tableau VII*).

Il existe donc de nombreux systèmes acide aminé/inhibiteur analogue pour lesquels on peut espérer rendre quantitative l'opposition

TABLEAU VII

BACTERIE	INHIBITEUR	ACIDE AMINE S'OPPOSANT A L'INHIBITION	REF.
<i>Escherichia coli</i>	l-isoleucine	l-leucine	(105)
<i>Escherichia coli</i>	méthyl-5-tryptophane	l-tryptophane l-tyrosine	(69) (69)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	méthyl-5-tryptophane	l-tryptophane l-tyrosine	(69) (69)
<i>Sarcinea lutea</i>	méthyl-5-tryptophane	l-tryptophane l-tyrosine	(69) (69)
<i>Escherichia coli</i>	p.fluorophénylalanine	acide phényl pyruvique l-phénylalanine	(69)
<i>Bacillus subtilis</i>	l-éthionine	acide glutamique méthionine	(69) (69)
<i>Sarcinea lutea</i>	l-éthionine	acide glutamique méthionine	(69) (69)
Plusieurs bactéries dont <i>Bacillus subtilis</i>	thiényl-2- alanine	phénylalanine tryptophane tyrosine	(70) (70) (70)

à l'arrêt de la croissance bactérienne provoquée par un analogue d'un acide aminé.

Une autre idée apparaît également, c'est la notion de balance entre l'inhibiteur et l'acide aminé. Existe-t-il un rapport possible à établir entre la quantité d'inhibiteur et la quantité d'acide aminé. Certains travaux [71, 72, 73] nous laissent penser que ce rapport peut être différent selon les conditions expérimentales, la nature de l'inhibiteur, la bactérie. Ainsi *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Bacillus cereus* utilisent préférentiellement la phénylalanine dans un milieu contenant en quantité équimoléculaire cet acide aminé et la p-fluoro-phénylalanine. Mais si, dans le cas des deux premiers germes, la p-fluoro-phénylalanine ne devient inhibitrice qu'à un taux, dans le milieu de culture, égal à 4 fois celle de la phénylalanine, dans le cas de *Bacillus cereus*, le taux de l'inhibiteur doit être supérieur de 10 fois par rapport à celui de l'acide aminé.

Ces travaux nous ont permis de penser d'emblée que pour chaque acide aminé, rien ne nous autorisait à décider d'avance du taux en inhibiteur souhaitable dans le milieu de culture. Seuls des essais préalables effectués dans des conditions opératoires précises nous autoriseraient à définir ce taux adéquat en inhibiteur, lui-même à notre avis lié aux taux en acide aminé des différentes solutions à analyser.

Chapitre 7

Choix d'une bactérie

- I) Etude concernant une bactérie sporulée du genre *Bacillus* autre que *Bacillus subtilis*
- II) Utilisation éventuelle d'une bactérie du genre *Lactobacillus* ou du genre *Leuconostoc*

* *

La croissance de nombreuses bactéries peut être inhibée par addition dans le milieu de culture d'un analogue d'un acide aminé. Nous avons souligné le caractère réversible de cette inhibition par addition ultérieure de l'acide aminé dans le milieu de culture. Dans le tableau de la page 61, on peut remarquer que différentes bactéries sont indiquées. Ceci n'est qu'une liste très limitative. Il faut ajouter *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* [49], *Lactobacillus plantarum* [75], *Streptococcus lactis* [76], *Bacillus megaterium*, *Leuconostoc dextranicum* [77, 78] pour ne citer que les principales bactéries.

Devant ce nombre relativement élevé de bactéries susceptibles d'être retenues pour la technique que nous préconisons, nous avons essayé de choisir une bactérie de croissance relativement facile et se prêtant à des dosages microbiologiques par diffusion en milieu gélosé.

Bien que notre choix ait été guidé par les travaux de R. GUTHRIE qui préconise *Bacillus subtilis*, nous avons cependant voulu effectuer une double tentative, à savoir :

— l'utilisation d'une autre bactérie sporulée aérobie. La facilité d'emploi de *Bacillus subtilis* est incontestablement liée à la possibilité

de travailler uniquement avec les spores de conservation et de manipulation aisées ;

- l'utilisation des lactobacilli, en ajoutant dans le milieu de culture du chlorure de triphényl-tétrazolium. Cette série d'essais a été effectuée pour vérifier l'hypothèse de KAVANAGH [61] qui considère l'addition de triphényl-tétrazolium comme moyen de faciliter la lecture des zones de croissance lors de l'emploi d'une méthode de dosage microbiologique basée sur le phénomène d'inhibition.

I. — Utilisation d'une bactérie du genre *Bacillus* autre que *Bacillus subtilis*

Le genre *Bacillus* est caractérisé par la présence d'une spore ellipsoïdale ou cylindrique. Cette spore peut être isolée de la forme bacillaire par tyndallisation à 70°C d'une suspension en eau physiologique obtenue à partir d'une culture en milieu gélosé.

On utilise donc, pour le dosage microbiologique, des suspensions de spores de conservation et de manipulation très faciles. La conservation est assurée à 4°C pendant plusieurs mois et peut être prolongée par une nouvelle tyndallisation au moment du besoin. Tenté d'utiliser une autre bactérie que *Bacillus subtilis*, nous avons essayé d'effectuer des dosages microbiologiques à l'aide de spore de :

— <i>Bacillus pumilus</i> — Souche de l'Institut Pasteur de Paris	5.268
— <i>Bacillus megaterium</i> — Souche de l'Institut Pasteur de Paris	5.952
— <i>Bacillus cereus</i> , var. <i>Thuringiensis</i> — Souche de l'Institut Pasteur de Paris	53.137
— <i>Bacillus cereus</i> — Souche ATCC ¹	10.702
— <i>Bacillus cereus</i> — Souche ATCC ¹	9.634
— <i>Bacillus coagulans</i> — Souche de l'Institut Pasteur de Paris	5.264
— <i>Bacillus badius</i> — Souche de l'Institut Pasteur de Paris	5.852

Les conditions préalables de culture de la souche, l'obtention des spores, les modalités d'ensemencement sont celles indiquées page 70.

Les essais que nous avons effectués comparativement à ceux utilisant *Bacillus subtilis* concernaient les dosages de la 1-phénylalanine, de la 1-méthionine et de la 1-leucine.

(1) American Type Culture Collection.

Les résultats obtenus sont classés par germe, mais même dans les cas où un dosage microbiologique s'avérait possible, l'emploi de *Bacillus subtilis* s'est montré plus facile et a permis des lectures de zones de croissance plus aisées. Les modalités techniques de l'essai sont exactement celles décrites dans le protocole général (p. 67), à une exception près concernant le taux en inhibiteur dans le milieu de culture, taux qui a été soit réduit de moitié, soit doublé en fonction d'essais préalables.

Les résultats sont consignés ci-dessous :

BACILLE	Croissance proportionnelle au taux en			Remarques et conditions opératoires particulières
	1-METHIONINE	1-LEUCINE	1-PHENYLALANINE	
BACILLUS PUMILUS I.P. - PARIS 5268	non	non	non	
BACILLUS CEREUS Var. <i>Thuringiensis</i> I.P. - PARIS 53137	oui	oui	oui	30°C - culture assez grasse
BACILLUS CEREUS ATCC 10702	oui	oui	oui	30°C - culture assez grasse
BACILLUS CEREUS ATCC 9634	oui	oui	oui	30°C - culture assez grasse
BACILLUS MEGATERIUM I.P. - PARIS 5952	oui	oui	oui	quantité d'inhibiteur pour la 1-méthionine le double de celui utilisé pour <i>B. Subtilis</i>
BACILLUS COAGULANS I.P. - PARIS 5264	non	non	non	
BACILLUS BADIUS I.P. - PARIS 5852	non	non	non	

Ainsi aucune des bactéries précitées du genre *Bacillus* ne présente d'avantage certain sur *Bacillus subtilis*, même dans les cas où la croissance bactérienne était proportionnelle aux taux en acide aminé.

II. — Utilisation d'une bactérie du genre *Lactobacillus* et du genre *Leuconostoc*

Dans le traité de microbiologie analytique de KAVANAGH [61], SHOCKMAN indique que l'on peut envisager l'emploi d'autres bactéries dont les bactéries du genre *Lactobacillus*, pour effectuer un dosage

bactériologique d'un acide aminé, basé sur l'antagonisme entre un inhibiteur analogue et cet acide aminé. Cependant l'auteur admet que l'intensité de la croissance bactérienne risque, lors de l'utilisation de certaines bactéries, d'être plus difficile à évaluer que celle de *Bacillus subtilis*.

Pour cette raison, il suggère d'ajouter au milieu de culture un sel de triphényltétrazolium. On sait que certaines bactéries réduisent ce sel en un dérivé rouge ou formazan. Cette réduction a été largement mise à profit dans l'étude de nombreuses bactéries comme les *Lactobacillaceæ* et les *Enterobacteriaceæ* dont *Escherichia coli*.

Nous n'avons effectué aucun essai avec *Escherichia coli*, bien que de très nombreux inhibiteurs aient été étudiés au sujet de sa croissance [85, 86, 87, 88, 89, 91, 121, 158, 164, 190, 192, 198, 199].

Par contre, nous avons étudié la possibilité d'utiliser *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* dont la croissance en présence d'inhibiteurs analogues a fait l'objet de travaux, d'autant que dans certains cas il est fait mention de la réversibilité possible de l'arrêt de la croissance par addition dans le milieu de culture de l'acide aminé correspondant [49, 86, 91, 161, 165].

Nous nous sommes intéressé à deux souches, très employées en tant que souches dépendantes, dans certaines conditions, d'un acide aminé [149, 150, 153] : *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 et *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042.

Les essais que nous avons effectués concernent uniquement le dosage de la lysine, cet acide aminé s'opposant à l'action inhibitrice de la S-bêta-aminoéthyl-cystéine [75, 112].

Les résultats obtenus ont été décevants et la croissance bactérienne nettement moins nette qu'en utilisant *Bacillus subtilis*. Les colonies apparues sur le milieu que nous proposons sont très petites et lenticulaires. La sensibilité de la méthode qui est faible n'est pas augmentée.

Il faut remarquer que le milieu proposé n'est pas très favorable à la culture des bactéries lactiques. Pour cette raison, nous avons pensé utiliser le milieu de Man Rogosa et Sharpe¹, plus adapté à la croissance des bactéries lactiques, sans toutefois parvenir à des résultats plus valables.

(1) Milieu de MAN, ROGOSA et SHARPE :

— Peptones d'hydrolysat de caséine	15 g	— Phosphate dipotassique.	5 g
— Extrait de levure	5 g	— Citrate d'ammonium ..	2 g
— Extrait de viande	5 g	— Sulfate de magnésium .	0,2 g
— Glucose	20 g	— Sulfate de manganèse .	0,05 g
— Tween 80	1 ml	— Acide sorbique	1,1 g
— Acétate de sodium ...	5 mg	— Gélose	15 g
		— Eau q.s.p.	100 ml

Il est intéressant de noter que BOLINDER et coll. [113] ont également utilisé sans succès une bactérie du genre *Lactobacillus*, lysine dépendante, pour établir une méthode microbiologique par diffusion en milieu gélosé et qu'ils ont définitivement préféré *Streptococcus faecalis* ATCC 6057.

Conclusion

En employant comparativement des bactéries du genre *Bacillus* et du genre *Lactobacillus*, nous avons pu constater que seules les bactéries sporulées appartenant au genre *Bacillus* présentent un réel intérêt. Cependant si *Bacillus cereus* et *Bacillus megaterium* semblent devoir être retenus, nous pensons que le choix de *Bacillus subtilis* reste le plus judicieux.

Il ne faudrait pas toutefois écarter par ce choix une bactérie comme *Escherichia coli* qui se prête facilement à l'établissement d'une méthode de dosage microbiologique par diffusion, d'autant que la révélation de la croissance pourrait être facilitée par addition au milieu de culture de triphényl-tétrazolium.

Chapitre 8

Elaboration d'une technique générale concernant le dosage microbiologique d'un acide l-aminé, basée sur le principe de l'utilisation d'un inhibiteur de croissance bactérienne analogue de l'acide l-aminé à doser

Deux points de vue essentiels nous ont guidé dans l'élaboration d'une technique générale : l'utilisation d'un milieu de culture dont la composition doit être la plus simple possible et l'emploi d'une souche bactérienne cultivant facilement, donnant des zones de croissance nettes en milieu gélosé et surtout ne présentant pas de mutation spontanée, c'est-à-dire se conservant aisément.

Ainsi, notre but a été essentiellement d'étudier une méthode se différenciant des méthodes microbiologiques classiques employant des souches bactériennes dépendantes, non seulement par le principe mais également par la préparation d'un milieu de culture de composition extrêmement simple et par l'utilisation d'une souche bactérienne en quelque sorte non spécifique.

En résumé, le dosage microbiologique de l'acide aminé devient fonction d'un seul facteur, le choix préalable de l'inhibiteur analogue.

Il faut cependant souligner que le choix de la bactérie et celui du milieu de culture résultent de travaux effectués simultanément, de telle sorte qu'il a fallu fixer un point de départ qui a été l'élaboration d'un milieu de culture adapté à une bactérie sporulée du genre *Bacillus*.

METHODE GENERALE PROPOSEE POUR LE DOSAGE D'UN « L » ACIDE AMINE

Utilisation de *Bacillus subtilis*

La méthode proposée est basée sur le principe suivant :

La croissance de *Bacillus subtilis* est inhibée par un antagoniste structural de l'acide aminé que l'on veut doser. L'antagoniste est incorporé au milieu de culture et s'oppose ainsi à la croissance du germe ensemencé dans l'ensemble du milieu de culture gélosé. Cette inhibition est cependant réversible si, au milieu de culture, on ajoute des quantités variables de l'acide aminé, ces quantités variables étant déposées à l'aide de disques. La croissance bactérienne peut ainsi apparaître autour du dépôt de l'acide aminé et cette croissance devenir proportionnelle à la quantité d'acide aminé présente. On assiste ainsi à une levée de l'inhibition proportionnelle à une quantité d'acide aminé.

Avant de définir les modalités précises de la technique microbiologique que nous préconisons, nous pensons utile de rappeler les principaux travaux qui ont été effectués dans ce but précis. Ce sont ceux de R. GUTHRIE et collaborateurs, et ceux de M.F. MASTROPIETRO CANCELLIERI et G. MORPURGO.

En 1961 et en 1962, R. GUTHRIE [58, 59], en 1963, GUTHRIE et SUSI [80], puis en 1964, GUTHRIE et WHITNEY [81] publièrent une méthode permettant de dépister des taux sanguins élevés en phénylalanine chez de jeunes enfants encéphalopathes, au moyen d'une réaction d'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis*, inhibition provoquée par la bêta-2-thiénylalanine et levée par la phénylalanine.

En 1964, R. GUTHRIE indique une technique comparable pour mettre en évidence des taux sanguins élevés en leucine [82] en utilisant également *Bacillus subtilis*.

En 1962, MASTROPIETRO CANCELLIERI et MORPURGO [69], puis MASTROPIETRO CANCELLIERI et PRINCIVALLE [48] publièrent des méthodes de dosages microbiologiques d'acides aminés et de bases puriques basées sur le même principe que l'épreuve de GUTHRIE. Nous mentionnons ces travaux dans les essais que nous avons effectués pour la mise en évidence de la guanine et de l'adénine (p. 47) et pour le dosage de la l-phénylalanine (p. 114), de la l-méthionine (p. 99) et du l-tryptophane (p. 125).

Cependant, contrairement à R. GUTHRIE, ces auteurs ne se sont pas appliqués à définir une méthode générale qui aurait eu, à notre

avis, l'avantage d'utiliser un même milieu d'essai, une même souche bactérienne, tandis que seul le choix de l'inhibiteur devient fonction de l'acide aminé que l'on veut doser.

Ainsi pour le dosage des bases puriques, ils utilisent *Bacillus megaterium*, pour la 1-méthionine *Bacillus subtilis*, pour le 1-tryptophane *Escherichia coli*, pour la 1-phénylalanine *Sarcinea lutea*, sans cependant préconiser le même milieu. Compte tenu d'adaptations successives relatives à la composition chimique du milieu de culture, ils n'indiquent ainsi aucun milieu d'essai général, tandis qu'ils notent certains échecs, en particulier celui qui leur fait abandonner *Bacillus subtilis* lors d'essais concernant la para-fluoro-phénylalanine pour le dosage de la 1-phénylalanine.

Pour notre part, nous nous sommes astreint à éviter toutes modifications essentielles du milieu de culture. Nous nous sommes efforcé à n'utiliser que *Bacillus subtilis* que nous avons choisi pour les raisons importantes suivantes, en partie exposées dans un chapitre précédent :

- vitalité de la bactérie sur les milieux de culture les plus simples, donc conservation aisée ;
- obtention facile de spores permettant de conserver des suspensions bactériennes plusieurs mois et définies une fois pour toutes par une étude photométrique préalable ;
- adaptation facile aux méthodes de diffusion, comme le laissent supposer les très nombreuses monographies concernant le dosage des antibiotiques ;
- zones de croissances nettes, donc lecture précise des résultats.

Il nous restait donc à définir les données suivantes :

- préparation et choix de souches de *Bacillus subtilis* ;
- température de l'essai ;
- milieu de culture ;
- les modalités de dépôt de l'acide aminé : nature et grandeur des disques ; utilisation éventuelle de cylindres ;
- matériel, disposition des disques en fonction de ce matériel ;
- préparation des solutions à doser et la préparation des solutions étalons ;
- mode de calcul, lors de la lecture des résultats ;
- choix de l'inhibiteur en fonction de l'acide aminé à doser ;
- limites de la méthode (spécificité).

I. — Préparation et choix de la souche de *Bacillus subtilis*

A) Référence de la souche :

La souche préconisée initialement par R. GUTHRIE et S. WHITNEY [81] est *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

Cependant, très rapidement, nous nous sommes aperçu que d'autres souches donnent des réponses tout aussi satisfaisantes, en particulier la souche ATCC 6633, utilisée dans le dosage des antibiotiques (néomycine, dihydrostreptomycine) ¹. En réalité, R. GUTHRIE préconise également, à l'heure actuelle, cette souche ATCC 6633 (catalogue de l'Institut Pasteur de Paris, IP 5262). Nous la préparons exactement comme il est indiqué ci-dessous.

B) Préparation de la suspension des spores :

Nous utilisons le procédé suivant :

La souche est conservée sur un milieu simple, après culture à + 37°C pendant quelques jours. Le milieu a pour formule :

— Peptone	6 g
— Protéolysat de caséine	4 g
— Extrait de viande de bœuf	3 g
— Glucose	1,5 g
— Gélose en poudre	12 g
— Eau distillée, q.s.p.	1.000 ml
pH 6-6,5 après stérilisation 30 minutes à 115°C	

Pour la conservation de la souche, le milieu coulé en tubes à essais 180 mm × 18 mm est incliné.

Pour obtenir une suspension de spores, le milieu précédent est coulé en fiole de Roux. Nous ensemençons sa surface largement, à l'aide d'une pipette Pasteur terminée en boule, à partir de trois tubes utilisés pour la conservation.

Après huit jours d'étuve à 37°C, la culture en surface est entraînée à l'aide de 30 ml d'eau distillée stérile en raclant à l'aide d'une pipette terminée en boule. La suspension ainsi obtenue est introduite dans une fiole de Fourneau de 125 ml, contenant 10 billes de verre de 4 mm de diamètre et un agitateur magnétique.

On porte au bain-marie à 60°C pendant trente minutes, puis sur l'agitateur magnétique pendant vingt minutes. Cette opération est renouvelée trois fois.

La suspension de spores ainsi obtenue se garde deux mois au réfrigérateur à + 4°C.

(1) Pharmacopée française, VIII^e ad., p. 1113.

Essai préalable lors de l'utilisation de cette suspension : 0,1 ml de la suspension précédente, conservée au réfrigérateur, est dilué avec 10 ml d'eau distillée stérile. Agiter et déterminer au spectrophotomètre à 650 nm en cuve de 1 cm la densité optique de cette suspension, en utilisant de l'eau distillée pour établir la densité optique égale à 0. On ensemence alors de 0,1 à 0,5 % en fonction des essais préalables.

En principe, la suspension diluée au 1/100^e doit avoir une densité optique à 650 nm, cuve de 1 cm, égale à 0,30, 0,40.

II. — Les conditions de température de l'essai

Lors du dosage explicité ci-dessous, nous avons recherché la température d'incubation la plus adéquate.

Les monographies relatives aux dosages des antibiotiques par des méthodes de diffusion en milieu gélosé indiquent le plus souvent des températures inférieures à 37°C. Ayant constaté, dans le cas des antibiotiques, que les réponses les plus linéaires sont obtenues avec des températures de + 30 à + 34°C, nous avons, pour cette raison, essayé d'abaisser la température d'incubation lors du dosage.

Les résultats ont montré très rapidement que, dans le cas présent où l'on recherche une croissance bactérienne dépendant d'un acide aminé, l'abaissement de la température se solde par un échec, même en faisant varier l'importance de l'ensemencement.

III. — Le milieu de culture

A) *Milieu proposé par R. GUTHRIE* [80, 81, 82] :

Pour le dépistage des taux sanguins anormaux en 1-phénylalanine, R. GUTHRIE utilise le milieu suivant :

— Glucose	5 g
— Phosphate bipotassique	15 g
— Phosphate monopotassique	5 g
— CINH_4	2,5 g
— Nitrate d'ammonium	0,5 g
— Sulfate de sodium	0,5 g
— Acide glutamique	0,5 g
— l-alanine	0,25 g
— l-asparagine	0,50 g

- Solution saline :
 - sulfate de magnésium
7 H₂O 10 g
 - chlorure de manganèse
4 H₂O 1 g
 - chlorure ferrique
6 H₂O 1 g
 - Cl₂Ca anhydre 0,5 g
- Solution de thiényl-2-bêta-alanine à
0,171 g % 2 ml¹
- gélose 15 g
- eau distillée, q.s.p. 1.000 ml

Cependant, en utilisant tel quel le milieu décrit, la méthode proposée manque, à notre avis, de sensibilité et nous avons remarqué que les résultats obtenus ne permettaient pas en réalité un véritable dosage. Rappelons que, dans la méthode de R. GUTHRIE, l'étalement comprend les points suivants : 2, 4, 6, 8, 12 et 20 mg en l-phénylalanine pour 100 ml de solution, et que l'auteur considère avant tout son épreuve comme une méthode de dépistage. De plus, pour les taux inférieurs à 4 mg pour 100 ml, la précision, à notre avis, devient mauvaise.

B) *Les modifications que nous avons jugées nécessaires pour augmenter la sensibilité de la méthode :*

- Dans « Phenylketonuria Detection in the Newborn Infant as a routine Hospital Procedure » [81], R. GUTHRIE indique qu'en doublant la teneur en glucose du milieu précédent, on obtient des zones de croissance microbienne plus intenses. Nous avons donc augmenté la teneur du milieu en glucose.
- Parallèlement, nous avons augmenté le pH du milieu en supprimant le phosphate monopotassique, nous inspirant des techniques décrites au sujet des dosages bactériologiques de la néomycine et de la dihydrostreptomycine, utilisant comme germe sensible *Bacillus subtilis* (Pharmacopée française, 1965, p. 723). Le pH est ainsi voisin de 8, celui préconisé par R. GUTHRIE étant légèrement inférieur à 7.
- Nous avons également diminué la teneur en gélose du milieu final. Le taux de 12 g % a été ainsi adopté. Nous avons en effet remarqué une bien meilleure diffusion de l'acide aminé, donc des zones de croissance plus larges en gélosant moins.

(1) Cet inhibiteur n'intervient que dans le cas particulier du dosage de la l-phénylalanine.

Cette augmentation de diffusion de l'acide aminé dans un milieu moins gélosé est en réalité très compréhensible. Cependant, à des taux inférieurs à 12 g ‰, on risque une solidification insuffisante du milieu lors de l'emploi d'agar-agar provenant de marques différentes.

Nous avons également appliqué cette modalité lorsque nous avons dosé la cyanocobalamine à l'aide d'une souche d'*Escherichia coli* dépendante, ce qui nous a permis d'augmenter considérablement la sensibilité de la méthode par diffusion que nous avons utilisée (p. 135).

- Nous avons utilisé dans divers essais, en lieu et place de la gélose, de l'agarose¹ permettant peut-être la lecture plus aisée des diamètres de croissance microbienne, tandis que les essais se conservent mieux au réfrigérateur, ceci laissant la possibilité de différer l'évaluation des diamètres de la croissance. Cependant, compte tenu du prix élevé de ce réactif, nous ne pensons pas qu'il y ait là grand avantage.

En opérant ainsi, nous avons sensibilisé, lors du dosage de la 1-phénylalanine, la méthode par un coefficient voisin de 3, puisque la gamme d'étalonnage comprend les solutions suivantes (concentration en 1-phénylalanine) :

- Solution étalon E 1 1 mg pour 100 ml
- Solution étalon E 2 2 mg pour 100 ml
- Solution étalon E 3 4 mg pour 100 ml

C) *Le point de vue pratique :*

Nous avons suivi la technique de R. GUTHRIE quant à la préparation du milieu de culture final, résultant de l'addition, au moment du dosage, de plusieurs milieux de base préparés séparément.

Milieu de base gélosé et glucosé :

- Glucose 20 g
- Gélose en poudre² 12 g
- Eau distillée, q.s.p. 500 ml

Répartir en flacons type transfusion de 250 ml à raison de 100 ml par flacon. Stérilisation à 110°C pendant trente minutes.

Milieu de base tamponné non gélosé (milieu de Demain, modifié, pH 8,1) :

- Phosphate bipotassique pur 25 g
- Chlorure d'ammonium 5 g

(1) Industrie Biologique Française, 92-Gennevilliers.

(2) Soit Difco (de préférence), soit Merck, soit Oxoïd, soit Prolabo.

— Nitrate d'ammonium	5 g
— Sulfate de sodium 10 H ₂ O	1 g
— Acide l-glutamique ¹	1 g
— l-asparagine ²	1 g
— l-alpha-alanine ³	0,5 g
— Eau distillée, q.s.p.	500 ml

Stérilisation à 110°C pendant 30 minutes

Solution saline concentrée :

— Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	10 g
— Chlorure de manganèse 4 H ₂ O	1 g
— Perchlorure de fer 6 H ₂ O	1 g
— Chlorure de calcium anhydre	0,5 g

Solution de l'analogue inhibiteur :

L'analogue inhibiteur est dissous pour les solutions les plus concentrées, soit dans de l'eau distillée stérile, soit dans une solution stérile de phosphate bipotassique à 2,5 g‰, comme c'est le cas pour les solutions étalons de l'acide aminé (p. 77). La solution finale peut être obtenue en diluant une solution concentrée dans la solution saline ci-dessus. On peut alors considérer, si cette dernière dilution a été réalisée dans la solution saline et à un taux assez important pour ne pas diminuer trop sensiblement la teneur en sels du milieu final, que cette dernière dilution constitue la solution saline nécessaire au milieu d'essai.

Pour la préparation du milieu final, on procèdera de la manière suivante.

Dans une fiole de Fourneau stérile, introduire :

— Milieu de base gélosé et glucosé liquéfié par passage au main-marie à + 50°C	100 ml
— Milieu de base tamponné, non gélosé, amené à une température de 60°C-70°C	100 ml
— Solution saline concentrée contenant ou ne contenant pas l'analogue inhibiteur	4 ml
— Le cas échéant : solution aqueuse ou dans le tampon phosphaté de l'analogue inhibiteur (maximum)	1 ml

Bien mélanger. Ensemencer alors le milieu maintenu à 48°C à l'aide de la dilution de la suspension de spores, le volume de la dilution devant être ajouté étant fonction des essais préalables (p. 71).

(1) Merck.

(2) Mann ou Calbiochem.

(3) B.D.H., Mann ou Calbiochem.

Il faut cependant faire ici une remarque très importante relative aux essais au cours desquels on utilise des plaques de verre de 25 à 27 cm $\times$ 25 à 27 cm. Dans ce cas précis, il est nécessaire de couler au préalable un milieu gélosé de base correspondant en fait au milieu que nous préconisons, ne contenant ni l'inhibiteur, ni la bactérie. Cette modalité est d'ailleurs systématiquement observée lors des dosages des antibiotiques ou de la cyanocobalamine réalisés avec ce genre de matériel. Le milieuensemencé et contenant l'inhibiteur est alors coulé secondairement sur le milieu gélosé de base refroidi au préalable à $+4^{\circ}\text{C}$.

IV. — Le matériel

1) *Disques et cylindres :*

Disques :

Nous avons utilisé des disques de 6 et 9 mm de diamètre. Les premiers n'ont pas présenté d'intérêt. Leur emploi était justifié par le fait que R. GUTHRIE découpe, à l'aide d'un emporte-pièce, dans les fiches de prélèvements, des disques de diamètre relativement petit (< 5 mm). En réalité, nous avons sensibilisé la méthode en augmentant le diamètre des disques. Ceux de 9 mm utilisés ont pour référence : Carl Schleicher et Schull, qualité 2668, ou Durieux, qualité type 268¹.

Cylindres :

Parallèlement, d'autres essais ont été effectués à l'aide de cylindres inoxydables, de diamètre extérieur 8 mm, diamètre intérieur 6 mm, hauteur 10 mm (Pharmacopée française, 1965, p. 1602). Ce procédé d'administration des solutions d'acides aminés ne donne pas de meilleurs résultats, en raison de la manipulation plus délicate et des dépôts plus longs à effectuer.

2) *Verrerie destinée à recevoir le milieu d'essai. Disposition des disques :*

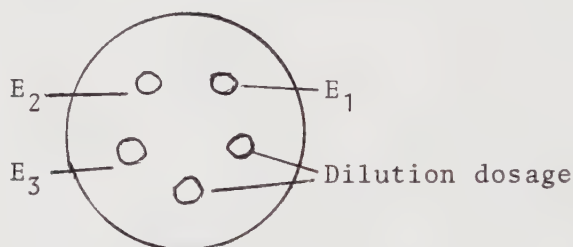
On peut utiliser, soit la boîte de Pétri classique, en verre ou en plastique, d'un diamètre de 140 mm de préférence, soit un matériel plus particulier et composé de deux plaques de verre de 25 cm

(1) Carl Schleicher et Schull, 11, rue d'Autancourt, Paris-17^e. — Durieux, 20, rue Malher, Paris-11^e.

à 27 cm $\times$ 25 à 27 cm, séparées l'une de l'autre par un cadre de cuivre ou d'acier inoxydable de 1 cm de hauteur et de 3 à 4 mm d'épaisseur.

Cas de l'emploi de boîtes de Pétri :

Nous avons simplifié la méthode en utilisant 9 boîtes de Pétri, sur lesquelles sont déposées trois valeurs de la gamme d'étalonnage (E 1, E 2, E 3) et une ou deux dilutions de la solution à doser, selon le schéma ci-dessous :



Les deux dilutions de la solution-dosage ne sont pas nécessairement au même titre, en particulier s'il s'agit d'essais préalables.

Cas de l'emploi des plaques de verre de 25 ou 27 cm $\times$ 25 ou 27 cm :

On dispose sur le milieu gélosé :

- une rangée de 8 disques espacés régulièrement et imprégnés de la solution étalon E 1 ;
- une rangée de 8 disques espacés de la même manière et imprégnés de la solution étalon E 2 ;
- une rangée de 8 disques espacés de la même manière et imprégnés de la solution étalon E 3 ;
- une, deux ou trois autres rangées de 8 disques espacés de la même manière et imprégnés des dilutions correspondant au dosage.

Dans les deux cas, boîtes de Pétri ou plaques de verre, le dépôt des disques est effectué de la façon suivante :

Plonger chaque disque dix secondes exactement dans la solution en s'aidant d'une pince fine et l'essorer sur le bord du récipient par deux retournements successifs.

Poser le disque sur la gélose en l'appuyant légèrement.

Nous avons constaté que cette manière d'opérer donnait des résultats tout aussi excellents et, le plus souvent, plus reproductibles que l'imbibition des disques par dépôt systématique d'un volume, par exemple 0,1 ou 0,05 ml, d'une solution amenée à un certain titre théorique en acide aminé.

V. — Préparation des solutions « dosage » et des solutions étalons

Les solutions servant à imbiber les disques sont faites dans un tampon phosphaté à 2,5 g % de phosphate bipotassique, ce qui correspond à une teneur en phosphate bipotassique égale au 1/5^e de celle indiquée dans le milieu de culture, lors de l'essai.

Dans le cas particulier des aliments hydrolysés dont nous avons évalué la teneur en 1-phénylalanine, il est nécessaire de neutraliser au préalable, puisqu'on a effectué une hydrolyse en milieu acide (le plus souvent HCl 6 N). On effectue alors la dilution finale avec la solution phosphatée.

Nous reproduisons ci-après un tableau récapitulatif des concentrations des solutions étalons des 1-acides aminés pour lesquels nous avons adapté la méthode microbiologique que nous préconisons.

1-acide aminé	Inhibiteur	E 1 *	E 2 *	E 3 *
HISTIDINE	Triazole 1.2.4. alanine	5	10	20
LEUCINE	dl-aza-4-leucine	1	2	4
LYSINE	S-amino-éthyl-1-cysteine	10	20	30
METHIONINE	l-méthionine dl sulfoximine	2	4	8
PHENYLALANINE	Thiényl-2-bêta-alanine	1	2	4
	p. fluoro-phénylalanine	1	2	4
TRYPTOPHANE	Méthyl-5-tryptophane	5	10	20
* Concentration en mg pour 100 ml				

VI. — Méthode de calcul

A) Etablissement de la courbe d'étalonnage :

Déterminer pour chaque valeur des solutions étalons E 1, E 2, E 3, les diamètres des zones de croissance à 0,5 mm près.

Calculer ainsi la moyenne des 9 réponses obtenues pour la même concentration, dans le cas de l'utilisation des boîtes de Pétri, et la moyenne des 8 réponses obtenues pour la même concentration, dans le cas de l'utilisation des plaques de verre.

Tracer la droite étalon en coordonnées semi-logarithmiques en inscrivant sur l'échelle logarithmique les trois concentrations de l'étalon, exprimées en mg de l-acide aminé pour 100 ml de solution finale utilisée pour l'imbibition des disques, et en ordonnée sur l'échelle arithmétique les moyennes des diamètres des zones de croissance correspondantes.

B) *Evaluation de la concentration en l-acide aminé de la solution à doser :*

Déterminer le diamètre moyen de croissance obtenu pour la solution-dosage (moyenne des 9 résultats dans le cas de l'utilisation des boîtes de Pétri et moyenne des 8 résultats dans le cas de l'utilisation des plaques de verre).

Se reporter sur la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration de la solution-dosage, exprimée en mg/100 ml.

Compte tenu des dilutions successives effectuées, déterminer alors la concentration en grammes pour mille du produit à analyser.

VII. — Choix de l'inhibiteur

Le choix de l'inhibiteur analogue pour un acide aminé est décrit dans le chapitre correspondant au dosage microbiologique de cet acide aminé. Un tableau récapitulatif a été dressé page 77. De même la teneur finale du milieu de culture en inhibiteur analogue est indiquée dans ce même chapitre.

Chapitre 9

Dosage de l'histidine

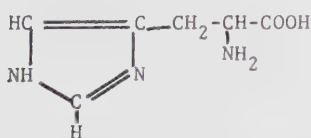
- I) Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-histidine
- II) Utilisation de la (thiazole 1.2.4.) 3 alanine

* *

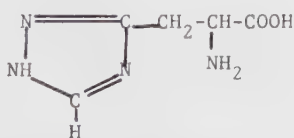
Un exemple d'utilisation d'un azadérivé comme antagoniste inhibiteur.

I. — Choix de l'analogue inhibiteur

Les inhibiteurs antagonistes de la l-histidine sont assez peu nombreux ; deux d'entre eux nous ont semblé importants : la thiazole-3-alanine et la (triazole-1.2.4) 3-alanine [83, 84]. Les travaux effectués concernent la croissance d'*Escherichia coli*.



HISTIDINE



TRIAZOLE 1-2-4 ALANINE
(AZADERIVE)

L'étude comparative de la molécule de l'histidine et des molécules précédentes permet de se rendre compte que :

- la thiazole-3-alanine est un analogue de l'histidine correspondant au remplacement d'un hétérocycle par un autre hétérocycle (thiazole pour imidazole), ceci devant être rapproché des analogues de la phénylalanine comme les thiénylalanines et les furylalanines ;
- que la (triazole 1, 2, 4) 3-alanine est en réalité un azadérivé de l'histidine (azahistidine). Or, il est nécessaire de souligner ici l'importance des azadérivés en tant qu'inhibiteurs de la croissance des bactéries.

L'importance des azadérivés en tant qu'analogues inhibiteurs doit être ici soulignée. Nous avons dressé un tableau limité aux principaux analogues indiqués dans la littérature :

<i>Dérivé Aza</i>	<i>Acide aminé</i>	<i>Bactérie</i>
Aza-4-leucine ¹	Leucine	<i>E. coli</i> [86]
Aza-7-tryptophane	Tryptophane	<i>E. coli</i> [87, 88, 89]
Azaphénylalanine ou pyridine-2-alanine	Phénylalanine	<i>E. coli</i> [85]
Hydroxy-5-pyridine 2-alanine	Tyrosine	<i>Leuconostoc dextranicum</i> [90]
Aza-4-lysine	Lysine	<i>Leuconostoc dextranicum</i> Bactéries lactiques [91] <i>E. coli</i>
Aza-8-diamino-2,6 purine ¹	Guanine Adénine	<i>Bacillus megaterium</i> [48]
Hydroxy-triazole-pyridine ¹	Hypoxanthine	<i>Leuconostoc</i> [49]
Triazole-1,2,4 3-alanine ²	Histidine	<i>E. coli</i> [83, 84]

(1) Utilisé par nous-même vis-à-vis de *Bacillus subtilis*.

(2) Nous tenons à remercier M. J.M. McGUIRE, des Laboratoires de Recherche de la Eli Lilly Company, qui a bien voulu nous procurer ce produit non commercialisé.

II. — Mode d'action de la thiazole-3-alanine et de la (triazole-1,2,4) 3-alanine

Ce mode d'action semble se situer au niveau de la formation du composé III ou phosphoribosyl-adénosine monophosphate, chaînon très important de la synthèse de l'histidine, puisque ce composé permet, en présence de glutamine ou d'ammoniaque, la formation d'un cycle imidazol.

Dans le cas présent, le composé III ne serait pas formé ; il est intéressant de noter que le métabolisme de l'histidine chez les bactéries, en particulier sa synthèse, a été en grande partie élucidé à partir de travaux effectués sur *Escherichia coli* [92, 93, 94, 95, 96].

III. — Les modalités techniques relatives au dosage de la l-histidine

Pour notre part, nous avons utilisé la triazole-1.2.4 alanine. Dans les conditions opératoires indiquées dans la technique générale (p. 67), le taux adéquat en inhibiteur du milieu d'essai a été trouvé égal à 1 mg pour 100 ml.

Les solutions de l-histidine pouvant être dosées par cette technique ont des taux compris entre 3 et 30 mg pour 100 ml. Les solutions étalons utilisées ont des concentrations en l-histidine égales à 5, 10 et 20 mg pour 100 ml (*fig. 8*).

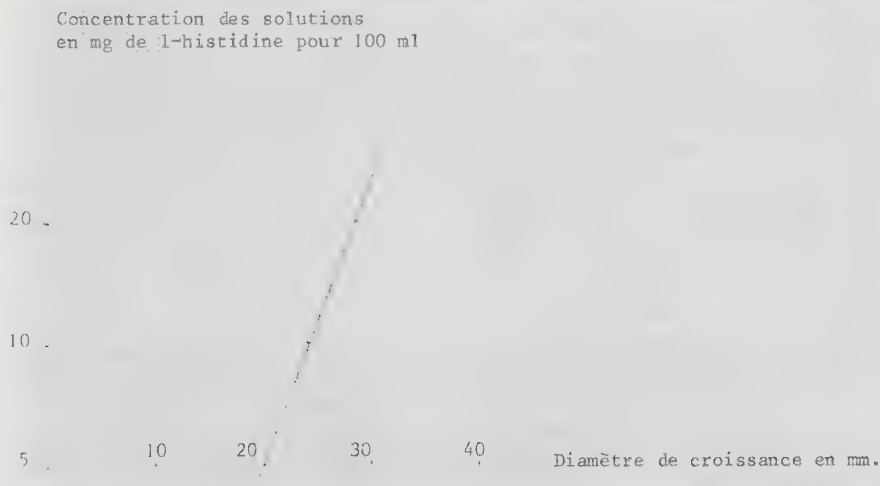


FIGURE 8
Dosage de la l-histidine

Analogue inhibiteur triazole (1, 2, 4) 3-alanine. Concentration dans le milieu de culture : 1 mg/100 ml. Germe utilisé : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

IV. — Résultats obtenus

Les différents échantillons de Nuoc Mam ont donné les résultats suivants :

<i>Référence des échantillons</i>	
NM 4	5,80 g ‰
NM 5	2,75 g ‰
NM 6	3,10 g ‰
NM 7	0,82 g ‰

Lors d'essais quantitatifs par chromatographie, les taux respectifs étaient (p. 39) :

<i>Référence des échantillons</i>	
NM 4	6,67 g ‰
NM 5	4,40 g ‰
NM 7	2,10 g ‰

Il semble donc que la technique physico-chimique donne systématiquement des résultats excédentaires par rapport à la détermination microbiologique ; nous nous sommes explicité sur ce point (p. 39), ayant pensé un moment donné que la méthode physico-chimique dosait le bloc histidine-méthylhistidine, tandis que la méthode microbiologique ne dosait que l'histidine ; malheureusement, comme nous l'avons souligné précédemment, nous n'avons pu affirmer la présence de méthylhistidine lors de nos essais chromatographiques.

Par contre, nous sommes assuré que dans les conditions opératoires préconisées dans la méthode microbiologique, la 1-méthyl-1-histidine et la 1-méthyl-3-histidine¹, pour des concentrations identiques à celles utilisées pour l'histidine, n'interfèrent en aucune façon dans le dosage.

(1) Calbiochem, 20, boulevard Saint-Germain, Paris-5^e.

V. — Spécificité de la méthode

Nous avons vérifié que les acides aminés suivants, aux mêmes concentrations, soit 10 mg pour 100 ml, n'interféraient pas :

— 1-phénylalanine, 1-tryptophane, 1-glutamine, 1-tyrosine, 1-valine, 1-leucine, 1-alpha-alanine, 1-méthionine.

Dans une série d'essais relatifs à des solutés injectables d'acides aminés médicamenteux¹, nous avons pu confirmer cette spécificité sur 6 lots différents contenant chacun au moins 8 acides aminés (de la forme dl). A l'inverse, deux solutés buvables médicamenteux contenant des protéolysats naturels² ont présenté une teneur en 1-histidine évaluable facilement par notre méthode.

Enfin nous sommes assuré que l'histamine aux mêmes concentrations ne donnait lieu à aucune croissance bactérienne.

Conclusion

En utilisant comme analogue inhibiteur la triazole-1,2,4 alanine ou azahistidine, nous avons non seulement corroboré la présence certaine de l'histidine dans le Nuoc Mam, à l'inverse des travaux de BLASS et RICHARD [23], mais nous avons également prouvé que les taux observés sont des taux relativement importants.

Les taux obtenus sont inférieurs à ceux trouvés par la méthode physico-chimique basée sur une séparation chromatographique préalable. Nous avons pensé que la méthode chromatographique dosait à la fois l'histidine et la méthyl-histidine, ceci expliquant les différences observées. Cependant dans deux séries d'essais, nous avons pu prouver que le Nuoc Mam ne contenait pas de méthyl-histidine et que même s'il en était autrement, la méthyl-histidine n'interférait pas dans le dosage microbiologique de la 1-histidine. De plus, nous avons éprouvé la spécificité de la méthode vis-à-vis de huit autres acides aminés sans parvenir à établir une interférence de l'un d'entre eux.

(1) Référence T 1 à T 8.

(2) Référence 01 et 02.

Chapitre 10

Dosage de la leucine

- I) Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-leucine
- II) Utilisation de la dl-méthyl-2-leucine
- III) Utilisation de la dl-4-azaleucine
- IV) Interférence de la l-isoleucine possédant une activité propre antagoniste

* *

Le dosage microbiologique de la leucine que nous proposons nous a permis de mettre en évidence un antagonisme de deux acides aminés présents dans un protéolysat.

I. — Généralités

Principaux analogues de la leucine

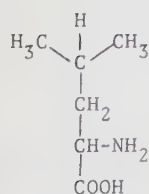
Les analogues antimétabolites de la leucine ont fait l'objet de travaux importants ; parmi les très nombreuses substances susceptibles d'interférer dans le métabolisme de la leucine au niveau des bactéries, on peut citer :

- la cyclopentane alanine [97, 98, 99] et la 1-cyclohexène 3-dl-alanine [102], molécules différant de la leucine par le remplacement du radical terminal $\text{—CH} = (\text{CH}_3)_2$ par un cycle ;
- la méthallylglycine, apparition d'une double liaison [100] ;

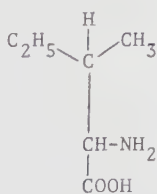
- la bêta-hydroxyleucine [103];
- la trifluoroleucine [104];
- la d-leucine [67], un des rares exemples où l'antagonisme de la forme d d'un acide aminé a été noté ;
- l'isoleucine [105, 106], cet antagoniste ayant fait l'objet, de notre part, de différents essais concernant son influence lors du dosage microbiologique de la l-leucine que nous avons essayé de mettre au point (cf. plus loin);
- la norleucine [100, 107], également antagoniste analogue de la méthionine [107, 107 bis];
- la dl-méthyl-2-leucine [104];
- la dl-aza-4-leucine [86] ou acide amino-2-diméthyl-amino-3-propanoïque.

Nos essais ont porté sur l'utilisation éventuelle de deux de ces analogues structuraux, la dl-méthyl-2-leucine et la dl-aza-4-leucine, une mention particulière devant être faite pour la norleucine et l'isoleucine, comme il est indiqué dans le paragraphe relatif à l'emploi de la dl-aza-4-leucine.

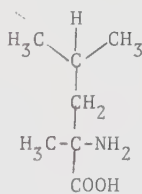
Ainsi, lors de nos essais relatifs au dosage microbiologique de la l-leucine, nous avons utilisé un dérivé méthylé, comme dans le cas du l-tryptophane, puis un azadérivé, comme dans le cas de la l-histidine :



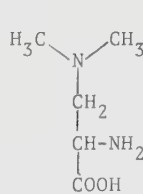
LEUCINE



ISOLEUCINE



METHYL-2-dl-LEUCINE



dl-4-AZALEUCINE

II. — Utilisation de la dl-méthyl-2-leucine ¹

Divers essais nous ont montré la faible activité de la dl-méthyl-2-leucine en tant qu'inhibiteur de la croissance de *Bacillus subtilis*. En effet, 200 mg de dl-méthyl-2-leucine dans 100 ml de milieu d'essai ne provoquent pas d'inhibition de la croissance du germe.

(1) Fournisseur Calbiochem, 20, boulevard Saint-Germain, Paris-5°.

III. — Utilisation de la dl-aza-4-leucine¹

La dl-aza-4-leucine s'est montrée par contre active au taux de 20 mg/100 ml.

A) Modalités du dosage proprement dit de la l-leucine en utilisant comme inhibiteur de *Bacillus subtilis* la dl-aza-4-leucine.

Nous avons définitivement adopté 20 mg de dl-aza-4-leucine pour 100 ml de milieu final, l'inhibiteur devant être ajouté au milieu de culture extemporanément, avant de couler celui-ci, par addition d'une solution concentrée aqueuse.

B) Les solutions étalons utilisées ont pour concentration les valeurs suivantes en l-leucine : 1 mg, 2 mg et 4 mg pour 100 ml (fig. 9).

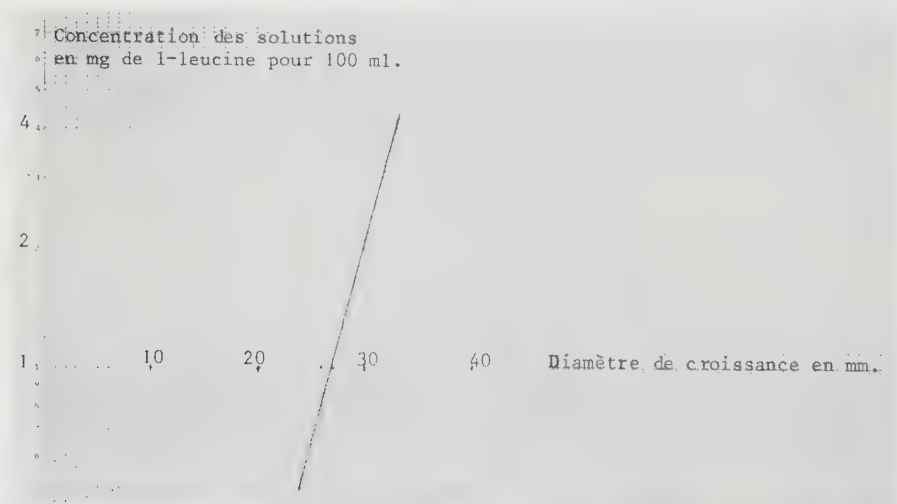


FIGURE 9
Dosage de la l-leucine

Analogue inhibiteur DL-aza-4-leucine. Concentration dans le milieu de culture : 20 mg/100 ml. Germe utilisé : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Compte tenu de ces conditions, les zones de croissances observées sont très nettes et les résultats relatifs à des solutions pures de l-leucine facilement reproductibles.

(1) Calbiochem fournisseur.

IV. — Résultats obtenus

A) En effectuant des dosages dans divers échantillons de Nuoc Mam et dans divers échantillons de protéolysats médicamenteux, notre attention fut attirée par certaines discordances obtenues en utilisant notre méthode comparativement à des méthodes physico-chimiques ; ces discordances nous ont semblé être systématiquement liées à des erreurs importantes par défaut lors de l'emploi de la méthode microbiologique. En effet :

— L'analyse de divers échantillons de Nuoc Mam nous a donné les résultats suivants reproductibles :

<i>Référence des échantillons</i>	
NM 4	1,55 g/1.000 ml
NM 5	1,25 g/1.000 ml
NM 7	1,40 g/1.000 ml

Or l'utilisation de la méthode chromatographique, décrite page 41, nous indique des taux très nettement supérieurs, de l'ordre de 6 g.

— Une autre série d'essais concernait des protéolysats pouvant être analysés par la méthode de MOORE et STEIN.

Les résultats obtenus nous ont montré que la technique microbiologique donnait des résultats déficitaires par rapport à la méthode physico-chimique, comme l'indique le tableau ci-après :

Protéolysats référence :	Autoanalyseur en gramme p. mille Technique MOORE & STEIN	Méthode microbio- logique, g p. mille
T	2,150	0,430
L	1,43	0,680
753	1,05	0,360
52	1,35	0,260
61	1,76	0,460
GM	2,58	1,320
77	1,64	0,300

B) Cependant, divers essais relatifs à des mélanges d'acides aminés contenant outre la 1-leucine, de la 1-tyrosine, de la 1-phényl-alanine, de la 1-valine, de la 1-alpha-alanine, de la 1-glutamine, de la 1-histidine, de la 1-méthionine¹, nous ont donné entière satisfaction.

(1) A une concentration identique à celle de la 1-leucine.

C) De même, nous avons pu prouver que la méthode était bien spécifique de la l-leucine, la forme d ne donnant aucune réponse et la forme dl donnant des réponses égales à environ 50 % de celles que l'on observe avec la forme l.

Ainsi, pour des solutions d'acides aminés contenant :

- 1,50 g de dl-leucine pour 1.000 ml
- 1,00 g de dl-leucine pour 1.000 ml

nous avons trouvé des taux, exprimés en l-leucine, respectivement de 0,680 et 0,570 g pour 1.000 ml.

Tous ces résultats nous permettent d'émettre deux conclusions :

- d'une part, lors de l'analyse de certains protéolysats, le dosage microbiologique de la l-leucine, que nous proposons, s'avère inutilisable ;
- d'autre part, dans les cas où nos résultats concordaient avec la théorie ou avec ceux obtenus par la méthode de MOORE et STEIN, la méthode microbiologique était bien spécifique de la forme l.

Ainsi, il nous fallait trouver la ou les raisons pour lesquelles, dans certains cas, la méthode microbiologique ne pouvait être employée.

V. — Antagonisme de l'isoleucine vis-à-vis de l'action de la l-leucine sur la croissance de *Bacillus subtilis* inhibée par la dl-aza-4-leucine (fig. 10)

Les discordances que nous avons soulignées ci-avant entre la méthode microbiologique et la méthode physico-chimique nous ont amené à étudier par chromatographie la composition qualitative de ces divers protéolysats dans le but de mettre en évidence l'interférence d'un autre acide aminé, interférence souvent notée dans les dosages microbiologiques (voir à ce sujet le chapitre concernant le dosage de la l-lysine pouvant être influencé par la présence d'hydroxylisine).

En comparant les chromatographies des protéolysats, dont le Nuoc Mam, pour lesquels la méthode microbiologique s'avérait inutilisable avec celles des protéolysats qui ont donné des résultats satisfaisants, nous nous sommes aperçu que dans les cas favorables, on ne notait pas la présence d'isoleucine, mise en évidence que nous nous sommes efforcé de réaliser, compte tenu des travaux de DOUDOROFF, HIRSCH et de COHEN [105, 106], qui ont permis de considérer l'isoleucine comme un antagoniste analogue de la leucine.

Une hypothèse de travail a donc été établie ; il s'agissait de prouver que l'isoleucine pouvait interférer dans le dosage microbiologique de la 1-leucine. Pour ce faire, nous avons préparé deux solutions d'acides aminés titrées à 1 mg/100 ml en chaque acide aminé suivant :

<i>Solution 1</i>	<i>Solution 2</i>
1-leucine	1-leucine
1-phénylalanine	1-phénylalanine
1-tyrosine	1-tyrosine
1-valine	1-valine
1-alpha-alanine	1-alpha-alanine
1-glutamine	1-glutamine
1-histidine	1-histidine
1-isoleucine	

Dans ces conditions, nous nous sommes aperçu que l'isoleucine s'opposait à l'action de la 1-leucine vis-à-vis de l'activité inhibitrice de la dl-aza-4-leucine, puisque, si pour la solution 2, le taux en 1-leucine trouvé était satisfaisant (0,94 mg pour 1 mg), le taux obtenu pour la solution 1 était inférieur à 0,5 mg pour 1 mg.

Dans une autre série d'essais, nous avons en outre prouvé que le déficit était proportionnel à la quantité d'isoleucine présente, comme l'indiquent les chiffres ci-dessous (voir également *fig. 10*).

Composition de la Solution	Diamètre de croissance en mm	Valeurs réelles obtenues
1-leucine 2 mg % + isoleucine 0,5 mg %	28,5 mm (pour 30 mm théorique) (1)	1,18 mg % (pour 2 mg)
1-leucine 2 mg % + isoleucine 2 mg %	26 mm (pour 30 mm théorique) (1)	0,8 mg % (pour 2 mg)
1-leucine 2 mg % + isoleucine 4 mg %	23 mm (pour 30 mm théorique) (1)	0,4 mg (pour 2 mg)
1-leucine 2 mg % + isoleucine 10 mg %	0 mm (pour 30 mm théorique) (1)	0 mg % (pour 2 mg)

Ainsi, la preuve est faite que la 1-isoleucine possède une activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance de *Bacillus subtilis*, ceci dans les conditions opératoires que nous préconisons.

(1) 30 mm étant le diamètre de croissance dans les mêmes conditions expérimentales données par une solution à 2 mg % en 1-leucine.

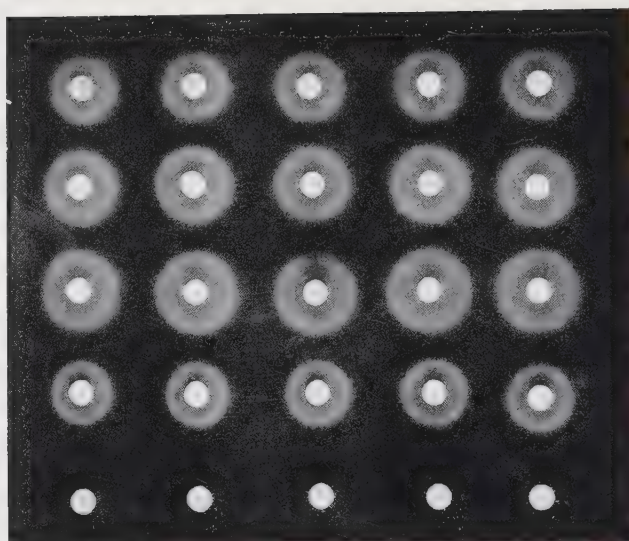


FIGURE 10

Influence de la l-isoleucine dans le dosage microbiologique de la l-leucine
Inhibiteur dl-aza-4-leucine

De haut en bas :

- Solution de l-leucine titrant 1 mg % (p/v).
- Solution de l-leucine titrant 2 mg % (p/v).
- Solution de l-leucine titrant 4 mg % (p/v).
- Solution de l-leucine titrant 2 mg % (p/v)
en présence d'une quantité égale de dl-isoleucine.
- Solution de l-leucine titrant 2 mg % (p/v)
en présence d'une quantité de dl-isoleucine 5 fois plus grande.

VI. — Conditions particulières relatives à l'antagonisme l-isoleucine/l-leucine lors de nos essais bactériologiques

Comme nous l'indiquons plus haut, cet antagonisme a été souligné par DOUDOROFF [105], puis par HIRSCH et COHEN [106]. Dans la publication de ces derniers auteurs, il s'agissait d'une souche d'*Escherichia coli* leucine dépendante, inhibée également dans sa croissance par la dl-méthionine et la l-valine. Pour notre part et dans les conditions expérimentales décrites page 67, nous n'avons pas remar-

qué d'antagonisme l-leucine/l-méthionine ou l-valine comme l'indiquent les résultats cités plus haut (essais des solutions d'acides l-aminés 1 et 2), mettant ainsi en évidence la complexité des phénomènes qui président à l'activité antagoniste d'une molécule analogue d'un acide l-aminé.

Cependant, nous croyons devoir souligner que, contrairement aux expériences habituelles, la l-leucine ne se trouve pas, lors de nos essais, introduite dans le milieu de culture, mais seulement au *niveau des disques imbibés de solutions diluées de protéolysats*.

Toutefois, nous avons pu relever dans la littérature que la thréonine désaminase de *B. subtilis* était inhibée par la l-isoleucine [106 bis].

Dans un autre ordre d'idée, puisque l'isoleucine s'oppose à l'action de la l-leucine, nous avons supposé qu'elle possédait par elle-même une activité inhibitrice dans les conditions opératoires préconisées. Ainsi, dans une série d'essais, nous avons réalisé des dépôts de solutions de concentrations égales à 1, 2, 4 et 10 mg/100 ml de l-isoleucine à l'aide de disques sur le milieu géloséensemencé mais ne contenant pas de dl-aza-4-leucine.

Contrairement à ce que nous pensions, aucune activité inhibitrice, c'est-à-dire aucune zone de bactériostase, au niveau des disques, n'a été remarquée, même à la concentration de 10 mg/100 ml.

VII. — Essais ayant pour but d'éviter l'action antagoniste de l'isoleucine

Pour éviter l'activité antagoniste de l'isoleucine, nous avons pensé l'introduire au préalable dans le milieu de culture. Ainsi la l-isoleucine devient un inhibiteur ajouté à un autre inhibiteur et la quantité d'isoleucine présente dans les protéolysats risque de ne plus interférer, compte tenu de sa présence dans le milieu d'essai.

Cette addition préalable au niveau du milieu de culture de l'acide aminé pouvant interférer dans le dosage microbiologique d'un acide aminé a été de nombreuses fois utilisée. Nous l'avons indiqué au sujet du dosage de la l-lysine influencé par la présence d'hydroxyline [108]. Il est bien entendu que, dans la technique élaborée par J. WUNSCHÉ, il s'agit d'éviter, non pas un effet antagoniste, mais un effet synergétique.

En outre, la publication de BOLINDER et collaborateurs [79] que nous avons citée en référence au sujet du dosage de la lysine, nous permettait de supposer l'importance du rapport l-isoleucine du milieu

de culture/l-isoleucine du protéolysat à analyser, et qu'à une certaine valeur de ce rapport, l'isoleucine du protéolysat risquait de ne plus interférer dans le dosage de la l-leucine.

Enfin, l'étude de la méthode microbiologique, maintenant classique, de la détermination de la l-leucine à l'aide de *Streptococcus faecalis* ou de *Leuconostoc mesenteroides*, montre que les milieux utilisés contiennent de l'isoleucine [109].

Nous avons, pour ces trois raisons, établi toute une série d'essais dans lesquels les rapports l-isoleucine du milieu de culture/l-isoleucine des solutions étalons étaient les suivants :

Concentration mg/ml dans le milieu - A -	Concentration mg/ml dans la solution - B -	Valeur du rapport A/B
0,10 mg	1 mg	0,1
0,25 mg	1 mg	0,25
0,50 mg	1 mg	0,50
1,00 mg	1 mg	1,00
2,00 mg	1 mg	2,00
4,00 mg	1 mg	4,00

L'ensemble des résultats nous indique que, quelle que soit la valeur du rapport (de 0,1 à 4), l'action inhibitrice de la l-isoleucine complémentaire à celle de la dl-aza-4-leucine vis-à-vis de la croissance de *Bacillus subtilis* est irréversible, ce, bien entendu, dans les conditions opératoires que nous préconisons.

VIII. — Essais en vue de mettre en évidence l'effet inhibiteur éventuel de la norleucine

Nous avons effectué des essais ayant pour but de déterminer si la l-norleucine possédait la même propriété inhibitrice que la l-isoleucine, compte tenu des travaux de HARDING et SHIVE [107]. Tous les résultats obtenus indiquent qu'il n'en est rien.

Il faut ajouter, en outre, que si la l-norleucine n'a pas une activité antagoniste vis-à-vis de la l-leucine, elle ne possède pas non plus d'activité identique à la l-leucine. En effet, une solution titrée à 2 mg pour 100 ml en l-norleucine et à 2 mg pour 100 ml en l-leucine ne provoque pas une croissance bactérienne supérieure à une solution titrée à 2 mg en l-leucine pour 100 ml.

Conclusion générale concernant le dosage microbiologique de la l-leucine par la méthode que nous préconisons

— L'utilisation de la dl-aza-4-leucine s'est avérée nettement supérieure à celle de la méthyl-leucine.

— Cette méthode n'est pas applicable quand la solution d'acides aminés contient en même temps de la leucine et de l'isoleucine. Il est donc nécessaire de s'assurer au préalable de l'absence d'isoleucine.

— Nous pensons cependant que la méthode, quand elle est applicable, donne d'excellents résultats, l'excellence des résultats étant due à la présence de zones de croissance extrêmement nettes et à une très bonne reproductibilité.

Chapitre 11

Dosage de la lysine

- I) Dosage microbiologique de la l-lysine
- II) Utilisation de la S-bêta-aminoéthyl-l-cystéine ou thiosine

* *

I. — Généralités

Les principaux antimétabolites susceptibles d'interférer dans le métabolisme de la lysine sont :

- l'acide amino-2-ol-6-caproïque (remplacement d'un groupe aminé par un hydroxyle) [110];
- l'acide diamino-2.6. heptanoïque ou méthyl-lysine [111] (un radical méthyle à la place d'un hydrogène);
- la S (bêta-aminoéthyl-l-cystéine) ou l-thiosine (un atome de soufre à la place d'un radical $\text{—CH}_2\text{—}$). Cet analogue possède des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* [112] et de *Lactobacillus plantarum* [75];
- une mention particulière doit être faite concernant la l-hydroxy-lysine ou acide diamino-2.6.ol-5-caproïque.

a) Bien que nous n'ayons pas trouvé mention de cet analogue comme inhibiteur de la croissance d'une bactérie, l'étude d'un travail de BOLINDER et collaborateurs nous a paru très intéressante [79, 113],

d'autant que ces articles sont relatifs au dosage de la lysine par une méthode microbiologique par diffusion utilisant comme germe sensible dépendant *Streptococcus faecalis* ATCC 6057.

Ces auteurs ont démontré que la présence de dl-hydroxylysine dans le milieu de culture d'essai peut, à certaines doses, provoquer une nette diminution de la sensibilité de la méthode ; ils admettent qu'au-dessus de 3 mg/100 ml, cet effet apparaît. De plus, phénomène important, le dépôt à l'aide de cylindres d'une solution titrant 1.000 μ g de dl-hydroxylysine provoque l'apparition des zones d'inhibition à la place des zones de croissance, ces zones d'inhibition peuvent disparaître par addition de dl-hydroxylysine dans le milieu d'essai.

C'est ce procédé que nous avons cru devoir employer lors du dosage de la l-leucine, quand nous avons mis en évidence le pouvoir inhibiteur de l'isoleucine sans toutefois parvenir à des résultats satisfaisants.

Cependant, trois autres points nous ont intéressé dans le travail de BOLINDER et collaborateurs. En effet, à des taux inférieurs au taux critique provoquant l'arrêt de la croissance bactérienne, trois phénomènes distincts ont pu être remarqués :

- à une concentration en dl-hydroxylysine égale à 2 mg à 2,5 mg pour 150 ml de milieu, on n'observe pas de légère croissance dans l'ensemble de l'essai, tandis que la sensibilité de la méthode est augmentée ;
- à une concentration inférieure à 1 mg pour 150 ml de milieu, on observe cette faible croissance dans l'ensemble de l'essai, sans toutefois que l'on éprouve de difficulté pour l'évaluation des diamètres autour des cylindres.

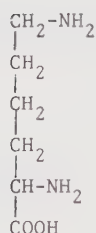
En résumé, un analogue peut être un inhibiteur à certaines concentrations, alors qu'à d'autres il permet d'augmenter la croissance bactérienne dépendant d'un acide aminé.

b) Nous avons également noté une référence intéressante relative à l'hydroxylysine. Elle concerne le dosage microbiologique de la l-lysine utilisant comme germe dépendant *Leuconostoc mesenteroides* P 60. J. WUNSCH [108] insiste sur le fait que la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* P 60 est susceptible d'être sensibilisée par la présence d'hydroxylysine dans les protéolysats dont on veut évaluer la teneur en l-lysine. L'auteur indique donc des résultats par excès et préconise, pour éviter ces erreurs par excès, d'ajouter au préalable au milieu de culture, de la dl et de la dl-allo- δ -hydroxylysine, mais, phénomène paradoxal, il ne mentionne pas de taux critique auquel on noterait une inhibition de la croissance de la bactérie.

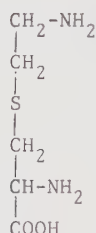
Il est important de noter que les travaux de BOLINDER et WUNSCHÉ qui illustrent la complexité des phénomènes biochimiques relatifs au métabolisme d'une bactérie ensemencée sur un milieu de culture, ont en commun deux données que nous n'avons pas retenues dans la méthode microbiologique que nous proposons :

L'emploi d'un germe dépendant et d'un milieu de culture dont la composition est très complexe, modalités qui ont été cependant insuffisantes pour pallier ce phénomène indiquant des interférences possibles. Ces interférences, pour notre part, nous les avons remarquées au sujet du dosage microbiologique de la l-leucine (p. 84).

II. — Utilisation de la S (bêta-aminoéthyl-l-cystéine) ou l-thiosine



LYSINE



S(BETA-AMINOETHYL-CYSTEINE)
(ou l-thiosine)

Nous n'avons pas effectué d'essais avec *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* pour les raisons exposées précédemment (p. 64).

a) Tous nos essais ont montré que le chlorhydrate de S (bêta-amino-éthyl-l-cystéine) n'était totalement inhibiteur vis-à-vis de la croissance de *Bacillus subtilis* dans le milieu qu'à un taux relativement élevé de l'ordre de 40 à 50 mg %, phénomène non négligeable compte tenu du prix coûteux de ce réactif¹.

D'autre part, à cette concentration de l'inhibiteur dans le milieu de culture, les solutions de l-lysine utilisées pour l'inhibition des dis-

(1) Fournisseurs : Cyclochemical Corporation, Los Angeles, California, U.S.A., et Twyford Laboratory, Twyford Abbey Road, London NW 10.

ques doivent être de concentrations relativement élevées, soit 50, 100 et 200 mg %. L'ensemble des résultats obtenus indique que les croissances bactériennes sont proportionnelles aux concentrations (fig. 11).

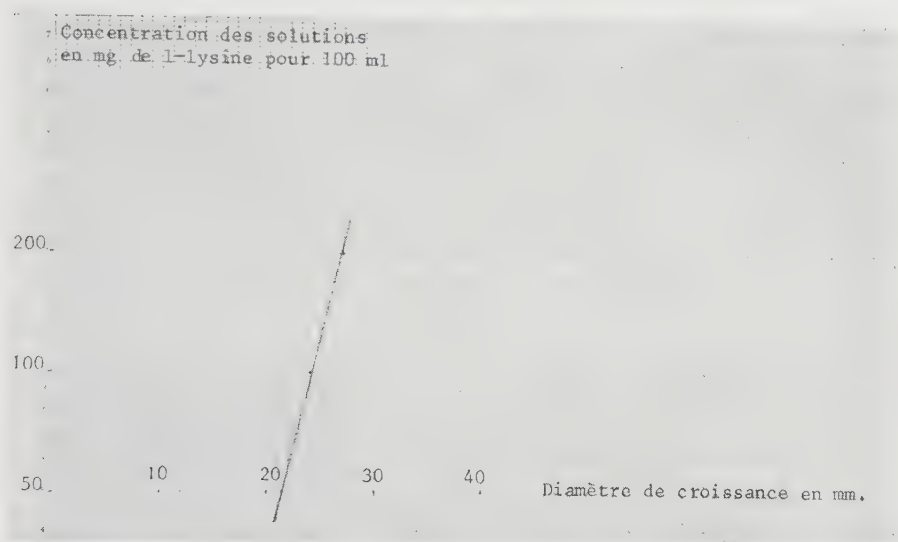


FIGURE 11
Dosage de la l-lysine

Analogue inhibiteur S-bêta-aminoéthyl-l-cystéine. Concentration dans le milieu de culture : 50 mg/100 ml. Germe utilisé : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

N.B. : Aucune croissance bactérienne de base dans l'ensemble du milieu de culture n'est remarquée à cette concentration de l'inhibiteur, mais ceci présente l'inconvénient de diminuer la sensibilité de la méthode.

b) En diminuant le taux de S (bêta-aminoéthyl-l-cystéine) dans le milieu d'essai, nous avons pu cependant obtenir des croissances bactériennes autour des disques, proportionnelles aux concentrations des solutions de l-lysine imprégnant les disques. Ainsi, au taux de 20 mg % en inhibiteur pour des solutions de l-lysine titrant 10, 20 et 30 mg %, les valeurs obtenues ont été les suivantes :

Référence de l'échantillon	g de l-lysine
NM 4	5,10 g
NM 5	2,40 g
NM 6	1,00 g
NM 7	0,170 g

Pour mémoire, nous rappelons que BLASS et RICHARD [13], et TRUONG VAN CHOM [21] indiquent des taux respectivement de l'ordre de 4 g ‰ et de 2,60 à 10 g ‰.

Cependant, dans ces conditions, l'inhibition de *Bacillus subtilis* n'était que partielle et le milieu de culture présentait une croissance bactérienne appréciable, tandis qu'on notait au niveau des disques une exaltation de cette croissance rendant assez délicate la lecture des résultats.

c) Devant cet échec, nous avons essayé d'utiliser *Bacillus cereus* dans les mêmes conditions opératoires.

Nous avons opéré à deux températures : 27°C et 37°C ; les résultats les plus favorables ont été obtenus à 27°C, mais sans toutefois être réellement satisfaisants.

Deux conclusions ont pu cependant être établies lors de l'emploi de *Bacillus cereus* :

- 1° La dose d'inhibiteur suffisante semble inférieure à celle nécessaire pour *Bacillus subtilis*, puisque aucune croissance bactérienne n'a été remarquée au taux de 15 mg %.
- 2° L'inhibition devenait réversible par dépôt de disques imprégnés de solution de l-lysine aux concentrations de 5, 10 et 20 mg %.

d) Enfin, nous avons vérifié, comme dans le cas des autres acides aminés, que la méthode préconisée était spécifique de la forme l, et que la l-alpha-alanine, la l-valine, la l-histidine, la l-leucine, la l-iso-leucine, la l-méthionine, la l-phénylalanine, le l-tryptophane et la dl-hydroxylysine n'interféraient pas.

Conclusion

Le dosage microbiologique de la l-lysine, basé sur l'emploi de la S-bêta-aminoéthyl-l-cystéine ou l-thiosine comme inhibiteur de croissance, nous a permis de nous rendre compte qu'il était parfois difficile d'obtenir une inhibition totale de la croissance bactérienne dans le milieu de culture de l'essai. Bien entendu, en augmentant le taux en inhibiteur, on réalise l'effet souhaité, mais ceci aux dépens de la sensibilité.

Enfin, nous nous sommes permis de souligner, au sujet de ce dosage, le prix élevé de l'analogue inhibiteur, point de vue qui ne doit pas être négligé dans l'élaboration d'une technique.

Chapitre 12

Dosage de la méthionine

- I) Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-méthionine
- II) Utilisation de la dl-éthionine
- III) Utilisation de la l-méthionine-dl-sulfoximine

* *

I. — Généralités

Les principaux analogues antimétabolites de la l-méthionine sont des molécules correspondant :

- soit à des modifications des radicaux liés au soufre dans la molécule de méthionine ;
- soit au remplacement du soufre par un autre atome ;
- soit à l'addition d'un groupe méthyle au niveau du carbone alpha.

A) *Modification des radicaux liés au soufre :*

Remplacement d'un radical méthyle par un radical éthyle : éthionine [49, 120, 119].

Molécule possédant un soufre hexavalent, méthionine sulfoximine [49] (et voir plus loin).

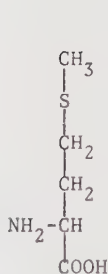
B) Remplacement du soufre par un autre atome :

- par un atome d'oxygène : méthoximine ou O.méthyl-homosérine [49];
- par un radical méthylène : norleucine [107];
- par un atome de sélénium : sélénométhionine [74, 114, 115].

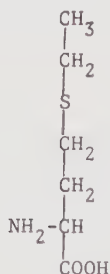
C) Addition d'un groupe méthyle :

Il s'agit de l'alpha-méthyl-méthionine [116, 117, 118] dont les antagonistes susceptibles de s'opposer à son action sont la méthionine, l'homocystéine et la cystathionine.

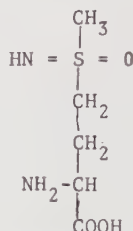
Notre étude en vue du choix d'un analogue inhibiteur de la croissance de *Bacillus subtilis* a porté uniquement sur la première catégorie des analogues précités, c'est-à-dire sur l'éthionine et la méthionine sulfoximine. La raison essentielle en est que si l'éthionine dans un premier temps nous a donné des résultats peu satisfaisants, la méthionine sulfoximine utilisée en second temps nous a permis des dosages reproductibles et faciles à réaliser.



METHIONINE



ETHIONINE



METHIONINE SULFOXIMINE

(ou M.S.O.)

II. — Utilisation de la l-éthionine en tant qu'inhibiteur de la croissance de *Bacillus subtilis*

Les premiers travaux concernant cet antagoniste datent de 1938. DYER [119] indique que la croissance des rats est nettement diminuée lorsqu'on substitue à leur nourriture la l-éthionine à la l-méthionine, phénomène que l'on évite par addition à la nourriture de cet acide

aminé. Quelques années plus tard, ROBLIN et coll. [49] d'une part, HALVORSON et SPIEGELMAN [120] d'autre part, confirmèrent l'action antagoniste de la l-éthionine vis-à-vis de la l-méthionine, mais dans ces deux publications, il s'agit de microorganismes. Plus récemment, COLEMAN et MARTIN ont étudié le comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis de cet analogue inhibiteur [121].

Il y a donc un antagonisme certain entre la l-éthionine et la l-méthionine, la l-méthionine pouvant à certaines doses éviter les actions inhibitrices de la l-éthionine sur la croissance des animaux de laboratoire ou sur les microorganismes.

Quant aux mécanismes d'action de la l-éthionine, divers travaux ont permis d'élaborer certaines hypothèses. Des essais effectués sur *Torula utilis* et *Saccharomyces cerevisiæ* [122] laissent supposer que l'antagoniste est métabolisé par la même voie que la l-méthionine. La formation de protéines anormales a été envisagée [123, 124, 125, 126]. YOSHIDA [128] indique que l'addition de l'éthionine dans une culture de *Bacillus subtilis* provoque l'apparition d'une alpha-amylase contenant l'antagoniste.

Une publications de MASTROPIETRO CANCELLIERI et MORPURGO [69] nous a particulièrement intéressé. Lors de l'utilisation de l'éthionine en tant qu'inhibiteur, ces auteurs ont décrit une méthode de dosage en utilisant comme germe *Bacillus subtilis* (souche de leur collection) et comme milieu de culture le milieu de Davis (p. 127). La quantité d'inhibiteur indiquée est de 3,264 mg par litre, taux qui nous paraît relativement faible compte tenu de nos propres résultats (voir plus loin). Les solutions dosées par la méthode proposée présentent des taux en l-méthionine compris entre 0,5 et 3 mg/100 ml. De plus, nous avons noté que les auteurs utilisent *Bacillus subtilis* sans élimination des formes bacillaires. Dans la publication, il est fait mention d'un autre germe susceptible d'être intéressant : *Sarcinea lutea*.

Pour notre part, les essais que nous avons effectués ont montré que les quantités d'inhibiteur nécessaires étaient plus élevées, de l'ordre de 2 mg pour 100 ml de milieu, et que les réponses obtenues n'étaient pas aussi nettes avec des solutions titrant en l-méthionine de 2 à 8 mg pour 100 ml que dans le cas de la l-méthionine-dl-sulfoximine.

III. — Utilisation de la l-méthionine-dl-sulfoximine en tant qu'inhibiteur de la croissance de *Bacillus subtilis*

1) *l-méthionine-dl-sulfoximine* antagoniste de la *l-méthionine* :

a) *l-méthionine* sulfoximine et croissance d'animaux de laboratoire :

En 1946, MELLANBY [129] établit que des animaux nourris de farines de blé traitées par le trichlorure d'azote (NCl_3) présentaient des crises convulsives.

En 1950, la substance responsable a été identifiée comme étant un métabolite anormal de la *l-méthionine*, la *méthionine-dl-sulfoximine* ou MSO [130, 131, 132]. Au préalable, BENTLEY, DERMOTT et PACE [133, 134] avaient isolé des farines un produit qu'ils avaient dénommé « facteur toxique » et qui, en réalité, devait être identifié à la *méthionine-sulfoximine*.

En 1951, BENTLEY [135] réalisa la synthèse de la MSO.

Pour en terminer sur les essais concernant les animaux, il semble que la toxicité de la *méthionine-sulfoximine* soit due, d'une part, à un effet antiméthionine et, d'autre part, à une interférence au niveau du métabolisme de l'acide glutamique et de la *l-glutamine* [136]. L'étude des étapes métaboliques a été faite de nombreuses fois, en particulier chez le rat, à l'aide d'une molécule marquée au ^{35}S [137]. L'interférence au niveau du métabolisme de la *l-glutamine* et de l'acide glutamique doit être ici soulignée, car elle a été remarquée également lors d'essais concernant les bactéries, comme nous l'expliquons plus loin (p. 111).

b) *l-méthionine-dl-sulfoximine* et croissance des plantes :

Nous avons également cité en référence du présent travail deux brevets pris récemment aux Etats-Unis et concernant la *l-méthionine-dl-sulfoximine* utilisée en tant qu'herbicide [138, 139].

c) *l-méthionine-dl-sulfoximine* et croissance bactérienne :

La *méthionine-dl-sulfoximine* s'oppose à la croissance de nombreuses bactéries :

- *Streptococcus* [140, 141];
- *Leuconostoc mesenteroides* P 60 [142];
- *Lactobacillus arabinosus* [143];
- *Bacillus cereus* [144].

Inversement cette substance serait, d'après MOLHO, susceptible de favoriser la croissance d'une souche d'*Escherichia coli* 113.3 [145], phénomène cependant controversé par VOLCANI [146].

L'addition au milieu de culture soit de l-méthionine [147], soit de l-glutamine [146] permet d'éviter l'effet inhibiteur de la méthionine sulfoximine.

Cette action antagoniste vis-à-vis de la MSO de deux acides aminés différents au niveau du métabolisme bactérien doit être rapprochée de celle indiquée au sujet des expériences sur les animaux. Elle a de suite attiré notre attention lors des essais concernant le dosage microbiologique de la l-méthionine (voir plus loin).

Enfin, il est intéressant de noter que HEATHCOTE et PACE [148] signalent que l'homologue inférieur de la méthionine sulfoximine ne possède aucune activité inhibitrice.

2) Modalités d'emploi de la l-méthionine-dl-sulfoximine et résultats obtenus (fig. 12) :

a) Nous avons utilisé la l-méthionine-dl-sulfoximine selon les modalités décrites ci-dessous, relatives au taux en inhibiteur et aux concentrations des solutions étalons.

— Teneur en inhibiteur du milieu d'essai : nous avons adopté une teneur égale à 0,15 mg pour 100 ml. L'inhibiteur est ajouté extemporanément avant de couler le milieu gélosé après avoir été dissous dans 1 ml d'eau distillée. Il est donc utilisé à un taux relativement faible.

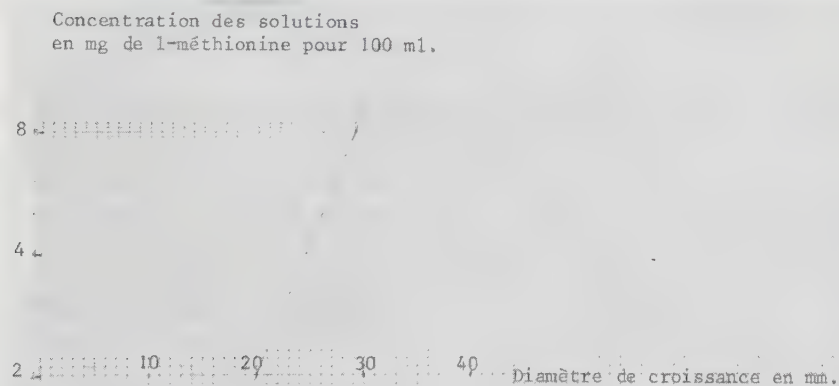


FIGURE 12
Dosage de la l-méthionine

Analogue inhibiteur l-méthionine-dl-sulfoximine. Concentration dans le milieu de culture : 0,15 mg/100 ml. Germe utilisé : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

— Les solutions étalons utilisées ont pour concentration en l-méthionine (fig. 13) :

— Solution E 1	2 mg pour 100 ml
— Solution E 2	4 mg pour 100 ml
— Solution E 3	8 mg pour 100 ml

La sensibilité de la méthode ainsi proposée est voisine de celle des méthodes microbiologiques utilisant des souches bactériennes dépendantes, comme la méthode de STEEL, SAUBERLICH, REYNOLDS et BAUMANN [149] employant *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042, la méthode de J.E. FORD employant *Streptococcus zymogenes* [150, 151], la méthode de RIESEN ou celle de BARTON WRIGHT [152, 153] employant *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014.

b) Résultats obtenus :

Les résultats que nous avons obtenus sur trois échantillons différents de Nuoc Mam sont :

Référence de l'échantillon	Taux en g‰
NM 4	3,10
NM 5	2,25
NM 7	1,75

3) Etude de la spécificité de la méthode proposée :

Quatre points ont été étudiés en ce qui concerne la spécificité de la méthode microbiologique envisagée :

- spécificité relative à la forme l ;
- spécificité relative à divers acides aminés susceptibles d'être présents dans un protéolysat ;
- spécificité relative à des amino-acides ou à des molécules soufrées ;
- spécificité relative à l'acide l-glutamique et à la l-glutamine.

• Spécificité de la méthode concernant la forme l :

Deux séries d'essais ont été effectuées :

— Essais sur des solutions de dl-méthionine ou de d-méthionine (fig. 14 et 15) : les solutions de dl-méthionine ou de d-méthionine étaient titrées à 2, 4 et 8 mg pour 100 ml. Nous n'avons obtenu aucune croissance bactérienne lors des dosages effectués sur les solutions de d-méthionine. Pour les solutions de dl-méthionine, la moyenne des réponses indique une valeur égale à 51,8 % de celles correspondant à la forme l.

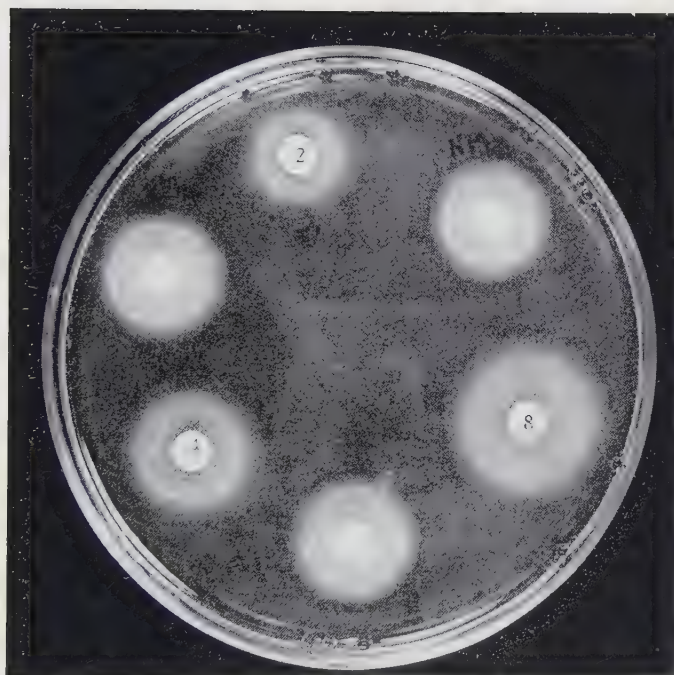


FIGURE 13

*Dosage microbiologique de la l-méthionine
dans trois échantillons de Nuoc Mam*

Inhibiteur : l-méthionine-dl-sulfoximine

Solutions étalons : 2, 4 et 8 mg % (p/v) de l-méthionine



FIGURE 14

*Comparaison des réponses obtenues avec des solutions de mêmes titres
en l-méthionine et en dl-méthionine
(inhibiteur l-méthionine-dl-sulfoximine)*

De droite à gauche, en partant du disque marqué d'une croix et en effectuant la lecture dans le sens inverse des aiguilles d'une montre :

- Solution titrée à 2 mg % en dl-méthionine
- Solution titrée à 2 mg % en l-méthionine
- Solution titrée à 4 mg % en dl-méthionine
- Solution titrée à 4 mg % en l-méthionine
- Solution titrée à 8 mg % en dl-méthionine
- Solution titrée à 8 mg % en l-méthionine



FIGURE 15

Dosage microbiologique de la l-méthionine

Inhibiteur : l-méthionine-dl-sulfoximine

Essais comparatifs concernant la d et la l-méthionine

Titre des solutions : 2, 4 et 8 mg % (p/v)

Les solutions de d-méthionine ne donnent aucune réponse

— Essais relatifs à l'analyse de protéolysats médicamenteux (fig. 16 et 17) : les protéolysats sur lesquels nous avons travaillé, à l'exception d'un seul, référencé MG, contenaient de la l-méthionine et de la dl-méthionine, tandis que l'échantillon référencé MG ne contenait que de la méthionine. Les résultats obtenus indiquent que la forme dl n'est dosée qu'en partie par la méthode microbiologique, tandis que la méthode physico-chimique de MOORE et STEIN, adaptée à l'auto-analyseur Technicon [45], évalue indifféremment les deux isomères :

REFERENCE DES LOTS	Teneur en méthionine en g p. mille (P/V)	
	Méthode de MOORE & STEIN	Méthode Microbiologique
T	2,200	1,060
375	1,100	0,680
16	2,180	1,400
25	1,950	1,220
77	1,900	1,250
MG	0,640	0,625

- *Spécificité de la méthode concernant divers acides aminés :*

Les solutions de l-phénylalanine, l-tyrosine, l-valine, l-leucine, l-alpha-alanine, l-histidine dosées à 5 mg % (p/v) n'ont permis aucune croissance bactérienne.

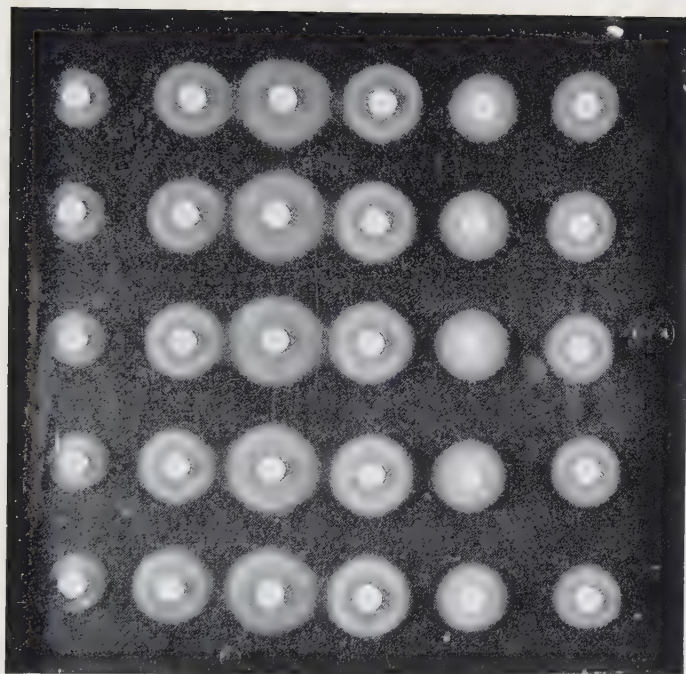


FIGURE 16

*Dosage de la l-méthionine/inhibiteur analogue
l-méthionine-dl-sulfoximine*

De haut en bas :

- Solution étalon à 2 mg % (p/v)
- Solution étalon à 4 mg % (p/v)
- Solution étalon à 8 mg % (p/v)

Analyse de trois protéolysats différents

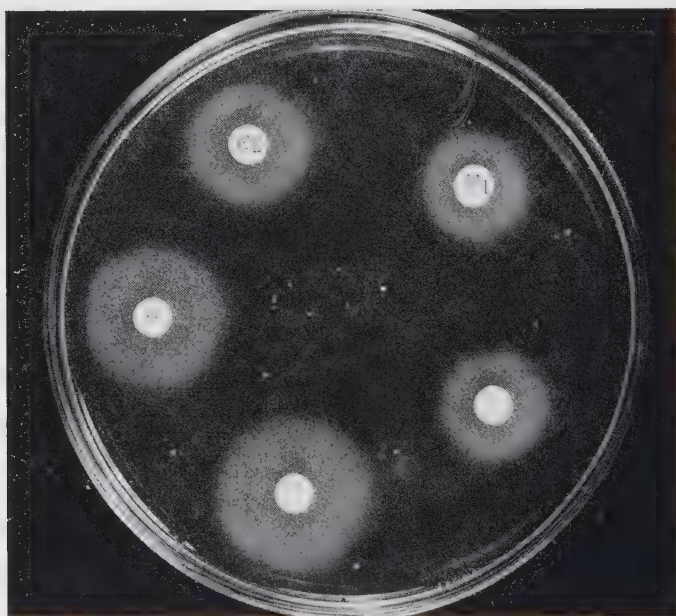


FIGURE 17

*Dosage microbiologique de la l-méthionine
dans un protéolysat dilué soit au 1/100^e, soit au 1/500^e*

Inhibiteur : l-méthionine-dl-sulfoximine

La gamme d'étalonnage qui comprend les valeurs : 2, 4 et 8 mg % (p/v), est située dans la partie supérieure de la photographie

- *Spécificité de la méthode concernant des acides aminés soufrés ou des molécules possédant un atome de soufre :*

Les molécules suivantes ont été ainsi étudiées à la concentration de 5 mg pour 100 ml (p/v) :

- la l-cystéine ;
- la l-cystine ;
- l'homocystéine ;
- la l-homocystéine ;
- la l-homocystine ² ;
- la dl-cystathionine ^{1,2} ;
- la dl-méthionine-sulfone ¹ ;
- la l-méthionine-sulfoxyde ¹.

La cystathionine et l'homocystéine ont été particulièrement étudiées, du fait que SONDRAS SCHLESINGER a indiqué que ces deux molécules, comme la méthionine, étaient susceptibles de s'opposer à l'action d'un inhibiteur de la croissance d'*Escherichia coli*, l'alpha-méthyl-méthionine [116]. Pour notre part, en aucun cas, la croissance de *Bacillus subtilis* est apparue par addition au milieu de culture de ces molécules. Une seule exception doit être cependant notée. Elle concerne la l-méthionine-sulfoxyde qui permet une croissance bactérienne très faible, mais non négligeable, puisqu'une solution titrée à 20 mg pour 100 ml (p/v) équivaut à une solution de l-méthionine titrée à 1 mg pour 100 ml (p/v).

Dans un autre ordre d'idée, il convient de noter que la dl-méthionine-sulfoxyde, molécule où un radical SOCH_3 remplace le radical COOH , a été plusieurs fois décrite comme inhibiteur antagoniste de l'acide glutamique [154, 155].

- *Spécificité de la méthode concernant la l-glutamine et l'acide l-glutamique :*

Cette spécificité revêt une grande importance pour deux raisons :

- d'une part, plusieurs publications [148, 156, 157] indiquent que l'effet inhibiteur de la l-méthionine-dl-sulfoxyimine disparaît en présence de l-glutamine ou d'acide l-glutamique ;
- d'autre part, l'acide glutamique se trouve en quantité non négligeable dans le Nuoc Mam (p. 43).

Nous avons donc étudié le comportement de *Bacillus subtilis* vis-à-vis de doses croissantes d'acide l-glutamique ou de l-glutamine. A des

(1) Nutritional Biochemical Corporation, France, 19, rue du Maréchal-Joffre, 91-Sainte-Geneviève-des-Bois.

(2) Métabolite essentiel du métabolisme de la l-méthionine.

doses dix fois supérieures, nous n'avons eu aucune réponse de la bactérie susceptible d'interférer dans notre essai.

Il est intéressant de noter à ce sujet que MASTROPIETRO CANCELLIERI et MORPURGO [69] ont étudié cette spécificité quand il s'agissait de mettre au point le dosage de la l-méthionine en utilisant l'inhibition évoquée par la l-éthionine sur la croissance de *Bacillus subtilis*. Ces auteurs, contrairement à ce que l'on aurait pu s'attendre, signalèrent également aucune interférence. Pour notre part, nous pensons que la composition du milieu d'essai que nous proposons, contenant une quantité d'acide l-glutamique appréciable, explique en partie l'absence d'interférence.

Compte tenu de cette explication plausible, nous avons alors effectué une série d'essais qui ont consisté à remplacer l'acide l-glutamique du milieu de culture par la l-méthionine. Ainsi nous pensions doser l'acide glutamique et la l-glutamine dans un protéolysat. Malheureusement, notre hypothèse ne s'est pas vérifiée comme exacte, du moins dans ces conditions opératoires, c'est-à-dire pour une même concentration en inhibiteur et pour des solutions à titrer contenant au plus 20 µg/ml d'acide l-glutamique ou de l-glutamine.

Au sujet de la l-glutamine, BOLINDER [113] et coll. ont indiqué que la l-glutamine risque d'interférer par antagonisme, c'est-à-dire en inhibant la croissance bactérienne lors des dosages de la l-lysine par une souche de *Streptococcus faecalis* ATCC 6057, lysine dépendante. Son pouvoir antagoniste pour certaines valeurs peut s'ajouter à celui de la l-hydroxy-lysine dont nous avons mentionné l'activité inhibitrice (p. 95).

Pour pallier cette interférence, les auteurs préconisent d'ajouter au milieu de culture la l-glutamine, mais ceci à un certain taux au-delà duquel le pouvoir inhibiteur risque d'apparaître. La solution technique donnée par ces auteurs est donc celle que nous avons essayé d'adopter pour le dosage microbiologique de la l-leucine en présence d'isoleucine (p. 90).

Conclusion

Pour établir le dosage microbiologique de la l-méthionine, nous avons utilisé deux analogues inhibiteurs : la l-éthionine et la l-méthionine-dl-sulfoximine (M.S.O.). Le premier, bien qu'agissant à un taux relativement faible, de l'ordre du mg pour 100 ml de milieu, s'est montré cependant d'un emploi moins aisé que le second.

La méthionine-dl-sulfoximine possède, en effet, une activité bactériostatique importante puisque l'inhibition de la croissance bactérienne est réalisée pour une concentration de 0,15 mg pour 100 ml de milieu. Cet analogue a été l'objet de travaux en tant qu'anti-métabolite, qu'il s'agisse de la croissance d'animaux, de plantes ou de bactéries. Ce qui est assez remarquable, c'est que de nombreux auteurs indiquent un antagonisme entre l'acide glutamique et la M.S.O. Or, pour le sujet qui nous préoccupe, cet antagonisme est en réalité bien inférieur à celui de la l-méthionine et de la M.S.O., à un tel point que l'acide l-glutamique ou la l-glutamine non seulement n'interfèrent pas dans la méthode que nous préconisons, mais se sont montrés incapables de faire réapparaître la croissance de *Bacillus subtilis* inhibée par la l-méthionine-dl-sulfoximine, même à des taux dix fois supérieurs à ceux nécessaires lors des dosages de la l-méthionine.

Le dosage microbiologique de la l-méthionine présente une étroite spécificité, comme l'ont prouvé non seulement les essais concernant certains autres acides aminés, mais également ceux relatifs aux acides aminés ou à des molécules soufrées comme la dl-méthionine-sulfone.

Enfin, la méthode proposée est d'une grande sensibilité et sa reproductibilité, due peut-être en partie à la netteté et à l'intensité des zones de croissance, est à comparer avec celle décrite pour la l-leucine et la l-phénylalanine.

Chapitre 13

Dosage de la phénylalanine

- I) Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-phénylalanine
- II) Utilisation de la p-fluorophénylalanine
- III) Utilisation de la bêta-thiényl-2-alanine
- IV) Application de la méthode à d'autres protéolysats que le Nuoc Mam, en particulier à des protéolysats médicamenteux et à des hydrolysats provenant d'aliments

* *

I. — Généralités

Les molécules analogues susceptibles d'interférer dans le métabolisme de la l-phénylalanine ont fait l'objet de très nombreuses publications. C'est au sujet de la l-phénylalanine que nous avons trouvé un grand nombre d'inhibiteurs de la croissance des bactéries, susceptibles d'être utilisés.

La majorité, pour ne pas dire la totalité des analogues antagonistes de la phénylalanine, sont des dérivés qui possèdent encore la molécule de l'alanine, à l'exception de la bêta-phényl-sérine [158, 159, 160, 161].

Les modifications apportées à la molécule de phénylalanine portent donc sur le radical phényl qui peut être :

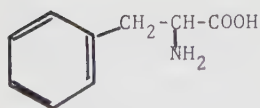
- Halogéné : chlorophénylalanine [162], bromophénylalanine [162] et surtout fluorophénylalanine [64, 163, 164, 165, 176].
- Aminé : aminophénylalanine [164, 166, 167].
- Nitré : p.nitrophénylalanine [164].
- Hydroxylé : tyrosine [168].
- Remplacé :
 - par un hétérocycle soufré : thiénylalanine [70, 160, 169, 170, 171, 172, 173];
 - par un hétérocycle oxygéné : furylalanine [100];
 - par un hétérocycle azoté : tryptophane [174];
 - par une chaîne linéaire : acide amino-2-méthyl-4-hexanoïque [175].

Ainsi, parmi les analogues antagonistes de la phénylalanine, apparaissent deux acides aminés naturels : la tyrosine et le tryptophane.

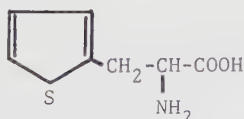
Un autre fait est intéressant lorsqu'il s'agit de l'inhibition de la croissance des bactéries par les analogues précités : cette inhibition est en général réversible presque exclusivement par apport dans le milieu de culture de l-phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane interférant très rarement. Par contre, dans le cas des inhibiteurs antagonistes de la tyrosine, en particulier la fluorotyrosine [162], la phénylalanine et le tryptophane sont tout aussi capables que la tyrosine de provoquer la réversibilité de l'inhibition.

Pour notre part, nous avons surtout retenu les fluorophénylalanines et la bêta-thiényl-2-alanine pour deux raisons :

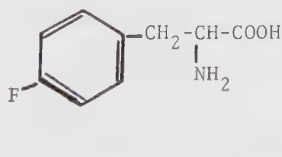
- d'une part, que la p-fluorophénylalanine a été utilisée dans le dosage de la l-phénylalanine par MASTROPIETRO CANCELLIERI et MORPURGO [69];
- d'autre part, que la bêta-thiényl-2-alanine fait l'objet d'une large utilisation dans l'épreuve microbiologique de dépistage en clinique humaine des sujets phénylcétonuriques [60, 177 - 58, 59].



PHENYLALANINE



BETA-THIENYL-2-ALANINE



p-FLUOROPHENYLALANINE

Les modes d'action de la p.fluorophénylalanine et de la bêta-thiényl-2-alanine semblent sensiblement identiques. COHEN et MUNIER [163, 178, 179] ont observé dans les deux cas que l'addition de

l'inhibiteur dans une culture d'*Escherichia coli* effectuée dans un milieu synthétique simple, avait pour conséquence une modification de la courbe de croissance de la bactérie, la croissance devenant sensiblement linéaire. Par contre, dans le cas de *Bacillus cereus*, l'addition de p.fluorophénylalanine provoque une modification plus sensible. On note un arrêt presque total de la croissance bactérienne au bout de quatre heures [72].

Les différentes études concernant le mode d'action de la p.fluorophénylalanine ont montré que cette molécule remplaçait en majeure partie la phénylalanine dans les protéines élaborées par les micro-organismes. De même, l'étude de l'exo-pénicillinase isolée d'une souche de *Bacillus cereus* ayant cultivé dans un milieu synthétique contenant de la p.fluorophénylalanine a montré que l'enzyme possédait plusieurs molécules de l'analogue aux dépens de la molécule de phénylalanine. L'enzyme ainsi élaboré possède une activité moitié moindre de celle de l'enzyme normal [62]. Ces deux remarques, incorporation de la p.fluorophénylalanine dans les protéines et incorporation plus particulière dans un enzyme, ont été également faites au sujet de la bêta-thiényl-2-alanine lorsque celle-ci est ajoutée dans une culture d'un bacille subtilis ou d'un bacille cereus.

Il est intéressant également de noter que, s'il y a modification des protéines du fait que la phénylalanine est remplacée en partie par la p.fluorophénylalanine, cette modification n'influence pas le métabolisme de la tyrosine [179]. Or, le métabolisme de la phénylalanine et celui de la tyrosine sont pourtant extrêmement voisins. Pour cette raison, il semble qu'il faut parler plus de remplacement d'une molécule par une autre molécule, plutôt que d'inactivations enzymatiques.

Quelles que soient les modalités d'action des p.fluorophénylalanines et des thiényl-alanines inhibiteurs, un fait important est incontestable et a été très bien étudié : la présence de phénylalanine à un certain taux empêche l'inhibiteur d'agir [72, 73, 180, 181].

Les bactéries sur la croissance desquelles a été mise en évidence cette propriété de la l-phénylalanine étaient *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Cependant la phénylalanine ne possède pas systématiquement cette propriété, quand il s'agit d'autres analogues ; peut-être peut-on envisager alors que les modalités d'action de ces antagonistes sont quelque peu différentes [164].

II. — Utilisation de la p.fluorophénylalanine

Nous avons utilisé la p.fluorophénylalanine de préférence à l'ortho et à la méta-fluorophénylalanine pour deux raisons :

- les publications concernant la p.fluorophénylalanine sont beaucoup plus importantes que celles concernant les deux autres composés qui agissent cependant selon les mêmes modalités ;
- MASTROPIETRO CANCELLIERI et MORPURGO [69] ont décrit une technique de dosage microbiologique de la phénylalanine en utilisant la propriété de cet acide aminé à lever l'inhibition de la croissance, de *Sarcinea lutea* par la p.fluorophénylalanine. La méthode proposée est une méthode par diffusion.

Au sujet de cette publication, il faut noter que les auteurs préconisent un milieu de Davis modifié (p. 127) contenant de nombreuses substances vitaminiques (riboflavine, nicotinamide, acide para-amino-benzoïque, pyridoxine, pantothénate de calcium, biotine, inositol, aneurine, acide folique). Sous prétexte d'exalter la croissance de *Sarcinea lutea*, ils utilisent donc un milieu extrêmement complexe. La lecture des résultats est tardive (72 heures). Elle ne peut être effectuée plus tôt que dans le cas d'un ensemencement plus important ayant la conséquence fâcheuse de diminuer la sensibilité de la méthode. Des solutions de dl-phénylalanine, et non de l-phénylalanine, aux taux de 10 à 40 $\mu\text{g/ml}$, servent pour l'étalonnage.

Les auteurs indiquent que, dans les conditions opératoires et à des concentrations égales, double ou quadruple, la tyrosine intervient pour à peine 10 % dans les résultats.

Le choix de *Sarcinea lutea* a été fait après des essais préalables montrant que la dl-p.fluorophénylalanine inhibait dans les conditions opératoires des cultures d'*Escherichia coli*, de *Klebsiella pneumoniae*, de *Salmonella typhimurium* et de *Sarcinea lutea*. Par contre, les auteurs signalent que la dl-p.fluorophénylalanine n'a aucune activité sur diverses souches de *Bacillus subtilis*.

Cette inhibition, à notre avis, appelle quelques critiques.

Tout d'abord, nous ne pensons pas que, dans l'élaboration d'une technique microbiologique basée sur les propriétés inhibitrices d'un analogue d'un acide aminé, il soit nécessaire de compliquer exagérément le milieu de culture de l'essai. Nous avons prouvé qu'il était préférable de baser les recherches en ne faisant varier que le seul facteur essentiel, c'est-à-dire la nature de l'analogue. Sont également critiquables deux autres points de vue :

- augmenter la sensibilité de la méthode en ensemençant moins le milieu gélosé, ce qui a pour conséquence fâcheuse de retarder la lecture des résultats ;
- étalonner la technique avec des solutions contenant l'acide aminé sous la forme dl.

Pour le premier point de vue, nous pensons que toute méthode microbiologique basée sur la diffusion en milieu solide doit présenter un temps d'incubation n'excédant pas vingt-quatre heures. Au-delà de ce temps, notre expérience nous permet de conclure qu'il est bien rare d'obtenir des résultats utilisables, exception faite pour les cas où l'organisme-test est un champignon inférieur du genre *Aspergillus* ou *Penicillium*.

Nous avons donc utilisé la dl-parafluorophénylalanine comme inhibiteur de la croissance de *Bacillus subtilis* dans le milieu gélosé que nous avons proposé dans la technique générale.

La dl-p.fluorophénylalanine, contrairement aux essais effectués par MASTROPIETRO CANCELLIERI et MORPURGO, s'est montrée un antimétabolite très utilisable, puisqu'à la dose de 5 mg pour 100 ml de milieu, la croissance bactérienne était totalement inhibée. Nous avons pu ainsi doser la l-phénylalanine dans des solutions en contenant de 1 à 10 mg pour 100 ml.

La spécificité et la sensibilité de la méthode nous ont paru être celles que nous avons indiquées au sujet de la dl-bêta-thiényl-2-alanine.

III. — Utilisation de la bêta-thiényl-2-alanine

Deux thiénylalanines ont été décrites comme inhibiteurs de la croissance de bactéries : la bêta-thiényl-2-alanine et la bêta-thiényl-3-alanine [173].

L'activité antimétabolique du premier analogue est quelque peu supérieure. Cette différence d'activité pouvant s'expliquer par le fait que la substitution en 2 permet d'obtenir une molécule de dimension plus proche de celle de la phénylalanine.

R. GUTHRIE utilise la dl-bêta-thiényl-2-alanine dans son épreuve de dépistage systématique des malades phénylcétonuriques. Nous avons également employé le composé racémique et non pas la forme 1 que FERGER et VIGNEAUD ont considéré comme seule forme susceptible d'inhiber la croissance bactérienne [70].

Les travaux concernant l'activité antimétabolique de la bêta-thiényl-2-alanine sont extrêmement nombreux [70, 170-171, 172]. Ils concernent la croissance des animaux, des bactéries et des champignons inférieurs.

Nous n'avons pas modifié la teneur en bêta-thiényl-2-alanine du milieu d'essai préconisé par R. GUTHRIE. Le taux en inhibiteur est donc de 0,342 mg pour 100 ml, ceci laissant supposer la forte activité du dérivé, compte tenu des taux qu'il nous a fallu retenir pour d'autres inhibiteurs.

Ce sont nos essais relatifs à la l-phénylalanine qui ont conditionné l'élaboration de la méthode générale préconisée. Pour ces raisons, nous avons étudié de façon plus importante le dosage de la l-phénylalanine dans le Nuoc Mam, dans divers protéolysats médicamenteux, dans des aliments hydrolysés par nos soins, et nous avons surtout voulu comparer les résultats obtenus par la méthode microbiologique avec ceux obtenus par des méthodes physico-chimiques classiques. La comparaison nous a permis, en outre, de donner à la méthode microbiologique certains avantages non négligeables.

La méthode proposée permet de déterminer dans des solutions des taux en l-phénylalanine compris entre 0,5 et 5 mg pour 100 ml. Pratiquement, nous effectuons un étalonnage comprenant trois points : 1, 2 et 4 mg pour 100 ml (*fig. 18*).

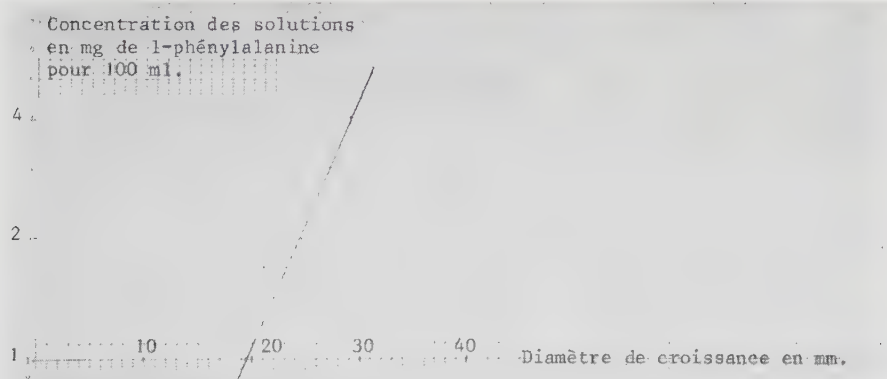


FIGURE 18
Dosage de la l-phénylalanine

Analogue inhibiteur bêta-thiényl-2-alanine. Concentration dans le milieu de culture : 0,342 mg/100 ml. Germe utilisé : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

IV. — Comparaison des résultats obtenus avec la méthode microbiologique utilisant la bêta-thiényl-2-alanine et ceux obtenus avec des méthodes physico-chimiques

Les résultats ont été comparés avec ceux que nous avons obtenus soit dans le Nuoc Mam, soit dans des protéolysats médicamenteux en employant deux méthodes physico-chimiques, l'une fluorimétrique, l'autre colorimétrique avec la ninhydrine, cette seconde méthode étant dérivée de celle de MOORE et STEIN appliquée à l'auto-analyseur Technicon.

Cependant nous avons essayé d'appliquer deux autres méthodes physico-chimiques, mais ces deux techniques se sont avérées inapplicables dans le cas du Nuoc Mam. Ces deux méthodes sont celles de HENRY, SOBEL et CHIAMORI [182] basée sur la réaction de KAPPELLER ADLER, et la méthode de LA DU et collaborateurs [183] qui est une méthode enzymatique.

La première méthode est inapplicable, du fait d'une forte pigmentation du Nuoc Mam que nous n'avons jamais pu éliminer, à l'exception toutefois des cas où nous avons pratiqué un dessalage important, mais ayant pour conséquence une perte considérable en acides aminés, donc en phénylalanine.

La seconde méthode nous a donné systématiquement des résultats trop faibles correspondant à peu près à la moitié de ceux que nous avons obtenus avec la méthode microbiologique et la méthode fluorimétrique. Nous n'avons cependant pas pu trouver une explication technique de ce phénomène.

En conclusion, le tableau ci-après permet de comparer les résultats obtenus par trois méthodes différentes :

- la méthode microbiologique que nous proposons ;
- la méthode fluorimétrique de McCAMAN et ROBINS [184] basée sur la réaction de la phénylalanine en milieu tamponné (acide succinique) avec la ninhydrine. L'exaltation de la fluorescence du produit obtenu lors de la réaction est facilitée par addition d'un peptide, la leucine-alanine. Cette méthode peut être appliquée à l'automation ;
- une méthode dérivée de la méthode de MOORE et STEIN dont nous avons fait déjà mention au sujet de la méthionine. A noter que pour cette méthode, la comparaison des résultats avec ceux obtenus par la méthode microbiologique n'a pu être faite que sur des protéolysats médicamenteux, puisque dans le cas du Nuoc Mam la

teneur élevée en chlorure de sodium de la solution exclut l'utilisation de la méthode de MOORE et STEIN sans la précaution préalable d'éliminer la presque totalité des électrolytes. Nous avons vu que cette élimination avait des conséquences fâcheuses (p. 48).

La lecture du tableau ci-joint permet de se rendre compte que les résultats obtenus sont sensiblement identiques dans certains cas, quelle que soit la méthode proposée (essais 1, 2, 3, 4, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Dans le cas des essais 10 et 11, nous n'avons

TABLEAU VIII

	ESSAI N°	BACTERIOLOGIE	FLUORIMETRIE	Méthode de MOORE & STEIN
NUOC NAM (échant. NM 4)	1	2,32 g p. mille	2,64 g p. mille	
NUOC NAM (échant. NM 7)	2	2,45 g p. mille	2,70 g p. mille	
NUOC NAM (échant. NM 6)	3	2,61 g p. mille	2,78 g p. mille	
Protéolysat	4	0,360 g p. mille	0,420 g p. mille	
Protéolysat contenant des acides aminés dl ajoutés réf. T.E.	5	0,900 g p. mille	1,74 g p. mille	
Protéolysat contenant des acides aminés dl réf. T.E. 50-3809	6	0,880 g p. mille	1,800 g p. mille	
Protéolysat O (buvable)	7	2,70 g p. mille	2,77 g p. mille	
Protéolysat T (buvable) réf. 51003 U2 glucidique	8	2,20 g p. mille	3,64 g p. mille	
Protéolysat injectable réf. 7502 U2	9	0,100 g p. mille	0,288 g p. mille	
Cynogram (✱)	10	0,022 g p. cent	0,010 g p. cent	
Lofenalac (✱)	11	0,055 g p. cent	0,080 g p. cent	
Bananes (✱✱)	12	0,013 g p. cent	0,016 g p. cent	
Carottes (✱✱)	13	0,034 g p. cent	0,039 g p. cent	
Haricots verts (✱✱)	14	0,072 g p. cent	0,077 g p. cent	
Lait G.	15	0,74 g p. cent	0,74 g p. cent	
Lait P.	16	0,96 g p. cent	0,97 g p. cent	
Protéolysat A 1	17	0,510 g p. mille	0,490 g p. mille	0,520 g p. mille
Protéolysat U 2	18	0,550 g p. mille	0,510 g p. mille	0,540 g p. mille
Protéolysat 7/53/4	19	1,18 g p. mille	1,04 g p. mille	1,10 g p. mille
Protéolysat 52/L	20	0,604 g p. mille	0,580 g p. mille	0,594 g p. mille
(✱) Aliment synthétique utilisé dans l'alimentation des enfants phénylcétonuriques (pas d'hydrolyse préalable).				
(✱✱) L'hydrolyse des aliments a été effectuée soit en milieu chlorhydrique 6N pendant 12 heures d'ébullition à reflux, soit en milieu chlorhydrique 6N à 100°C en tubes scellés pendant 24 heures.				

pas vérifié les valeurs annoncées par le fabricant, valeurs apparaissant dans la colonne « fluorimétrie », mais la méthode microbiologique confirme les faibles teneurs en l-phénylalanine prévues pour ces aliments diététiques.

Par contre, les discordances très importantes observées lors des essais 5, 6 et 8 sont relatives à des protéolysats contenant de la dl-phénylalanine, cette présence nous ayant été confirmée par le fabricant. Nous avons également noté une discordance importante dans l'essai 9 entre la méthode microbiologique et la méthode fluorimétrique, bien qu'aucune addition en dl-phénylalanine n'ait été effectuée. A ce sujet, compte tenu de la formule qui nous a été confirmée, il semble probable que certaines substances à nombreuses fonctions alcool présentes dans certains protéolysats soient susceptibles d'exalter l'intensité de la fluorescence.

V. — Etude de la reproductibilité des résultats lors de l'utilisation de la bêta-thiényl-2-alanine pour la méthode microbiologique

Les résultats concernant cette reproductibilité sont consignés dans le *Tableau IX* :

TABLEAU IX

REFERENCE de l'échantillon ou du lot	E S S A I S								Moyenne (m) 9	Ecart type (s) 10
	1	2	3	4	5	6	7	8		
NUOC NAM (NM 4)	2,30	2,20	2,32	2,50	2,70	2,30	2,61	2,50	2,43	0,175
NUOC NAM (NM 7)	2,40	2,70	2,50	2,80	2,40				2,56	0,195
NUOC NAM (NM 6)	2,40	2,25	2,15	2,30	2,30				2,28	0,090
NUOC NAM (NM 5)	2,00	2,20	2,20	2,20	2,10				2,14	0,0894
Protéolysat Lot 190 L2	0,360	0,355	0,300	0,325	0,315				0,331	0,078
Protéolysat injectable lot 7506 U2	0,100	0,085	0,142	0,141	0,127				0,119	0,024
Protéolysat CRI/A	0,200	0,220	0,160							
Protéolysat O/buvable	3,0	2,70	2,74	2,70	3,24	2,87	3,1		2,908	0,213
Protéolysat TE 50 ref. 3809	0,880	0,870	0,880	0,875	0,850	1,01	0,894	1,15	0,926	0,102
Protéolysat buvable ref. 51003 U2 (glucidique)	2,20	2,40	2,20	2,10	2,35				2,25	0,122

VI. — Etude de la spécificité du dosage microbiologique lors de l'utilisation de la bêta-thiényl-2-alanine pour la méthode microbiologique

A) Spécificité vis-à-vis de la forme d et de la forme dl :

L'analyse du tableau (p. 121) montre que seule la l-phénylalanine est quantitativement dosée. Ainsi l'addition dans un protéolysat de dl-phénylalanine et *a fortiori* de d-phénylalanine peut être décelée, la discordance entre les résultats obtenus par la méthode biologique et ceux obtenus par les méthodes physico-chimiques classiques étant d'autant plus importante que le pourcentage en l-phénylalanine est plus bas.

Nous avons vérifié que la méthode microbiologique ne dosait absolument pas la forme d et donnait pour la forme dl des réponses d'environ 50 % par rapport à celles observées pour la forme l, considérées égales à 100 %.

Ces vérifications sont indiquées ci-dessous :

Taux théorique en dl-phénylalanine de la solution	Résultats exprimés en l-phénylalanine
1 mg pour 100 ml	0,52 mg %
2 mg pour 100 ml	1,15 mg %
4 mg pour 100 ml	2,09 mg %

Ceci corrobore les données de la littérature et les travaux de ADRIAN [153] qui a utilisé *Lactobacillus plantarium* l-phénylalanine dépendante.

Des essais fluorimétriques menés en parallèle nous ont confirmé que la méthode de McCAMAN et ROBINS dosait sans distinction les trois formes [184].

B) Spécificité vis-à-vis d'autres acides aminés :

Nous avons voulu nous assurer que d'autres acides aminés n'étaient pas susceptibles de réagir de la même façon que la l-phénylalanine. Nous avons ainsi étudié le comportement de *Bacillus subtilis* en présence de solutions d'acides aminés suivants, titrés à 2 mg % : l-tyrosine, l-leucine, l-alpha-alanine, l-glutamine, l-méthionine, l-valine, l-histidine, l-cystéine, l-cystine, l-glycine, l-sérine.

Dans tous les cas, aucune croissance de *Bacillus subtilis* n'a été remarquée.

Conclusion

Deux analogues de la l-phénylalanine, inhibiteurs de la croissance de *Bacillus subtilis*, ont été utilisés. Ce sont la p-fluorophénylalanine et la bêta-thiényl-2-alanine. A notre avis, ces deux composés sont également utilisables, et si nous avons en définitive opté pour le second, c'est que nous nous sommes inspiré des travaux de R. GUTHRIE relatifs à l'évaluation des taux sanguins élevés en l-phénylalanine chez des encéphalopathes phénylcétonuriques.

C'est peut-être en utilisant un milieu d'essai bien défini et simple que nous avons pu employer la p.fluorophénylalanine que certains auteurs n'ont pas cru devoir retenir.

Dans ce chapitre, nous avons effectué une étude comparative entre une méthode d'évaluation de la phénylalanine par fluorimétrie et celle que nous préconisons. Cette étude n'a pas seulement porté sur le Nuoc Mam, mais a été étendue à des protéolysats médicamenteux et également à des aliments hydrolysés par nos soins. Nous avons ainsi pu nous rendre compte que la méthode microbiologique est applicable à des solutions d'acides l-aminés de provenances les plus diverses.

Enfin à la spécificité de la méthode s'ajoute une très bonne reproductibilité, d'une valeur égale à celle observée pour la l-leucine et la l-méthionine.

Chapitre 14

Dosage du tryptophane

- I) Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé du l-tryptophane
- II) Utilisation du dl-méthyl-4-tryptophane et du dl-méthyl-5-tryptophane

* *

I. — Généralités

Les analogues antagonistes du tryptophane correspondent à des molécules qui, comparées au l-tryptophane :

- ne possèdent plus de chaîne latérale, comme l'indole [185];
- présentent une modification de la chaîne latérale, comme l'acide indole acrylique [186] (perte du radical NH_2);
- correspondent à des azadérivés : azatryptophane [87, 88] et tryptazan [187], azadérivés dont nous avons noté l'importance dans le chapitre relatif au dosage de l'histidine ;
- présentent une modification de l'azote de l'hétérocycle comme la benzothiénylalanine [188];
- sont des dérivés fluorés comme le fluoro-5-tryptophane [189, 190] et le fluoro-6-tryptophane [191], dérivés fluorés dont nous avons vu l'importance en tant qu'analogues antagonistes lors du dosage de la l-phénylalanine ;
- correspondent à des dérivés méthylés dont le méthyl-4-tryptophane, le méthyl-5-tryptophane et le méthyl-6-tryptophane [178, 192, 193, 194, 195, 196].

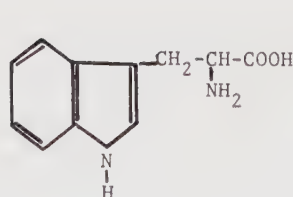
Pour certains de ces analogues, comme le méthyl-4-tryptophane, le méthyl-6-tryptophane et l'acide indole acrylique, le mode d'action correspond à une inactivation dans la cellule bactérienne d'une synthétase (ou desmolase) qui permet la condensation d'une molécule d'indole et d'une molécule de sérine : cette condensation a pour résultat la formation d'une molécule de tryptophane [191]; ceci indique que l'inhibition a lieu au stade terminal de la synthèse de l'acide aminé.

Mais tous n'agissent pas à ce niveau. Ainsi, le méthyl-5-tryptophane agit dans le premier stade de la synthèse, c'est-à-dire au niveau de la formation d'acide anthranilique [197], tandis que le fluoro-5-tryptophane agirait au niveau d'un stade intermédiaire [198, 199].

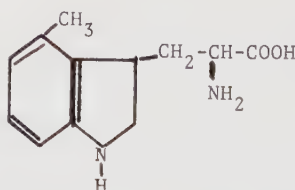
II. — Utilisation des méthyltryptophanes

C'est délibérément que nous n'avons effectué aucun essai avec le méthyl-2-tryptophane que LESTER et collaborateurs ont trouvé inactif [196]; par contre, deux dérivés nous ont semblé intéressants :

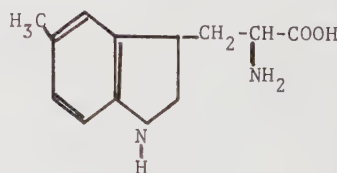
- le méthyl-4-tryptophane considéré comme un inhibiteur puissant [192];
- le méthyl-5-tryptophane utilisé par MASTROPIETRO CANCELLIERI et G. MORPURGO [69].



TRYPTOPHANE



METHYL-4-TRYPTOPHANE



METHYL-5-TRYPTOPHANE

a) Utilisation du méthyl-5-tryptophane :

Dans une première série d'essais, nous basant sur les travaux de M.F. MASTROPIETRO et G. MORPURGO [69], nous avons utilisé comme inhibiteur le méthyl-5-dl-tryptophane.

Deux points essentiels diffèrent entre la technique générale que nous proposons et celle de ces auteurs : la composition des milieux de culture et la bactérie utilisée.

— Le milieu de culture employé par les auteurs italiens est celui de DAVIS, dont la composition est la suivante :

— Nitrate d'ammonium	1 g
— Sulfate d'ammonium	1 g
— Phosphate disodique anhydre	4 g
— Phosphate monopotassique	2 g
— Chlorure de sodium	1 g
— d-glucose	10 g
— Extrait de levure	1 g
— Géluse	20 g
— Eau, q.s.p.	1.000 ml

pH : 6,6 — température de l'essai : 37°C

— La bactérie dont on évalue la croissance est *Escherichia coli*, souche B 27, référencée par les auteurs sans spécification particulière.

La méthode ainsi proposée permet de doser le l-tryptophane dans des solutions en contenant de 5 à 30 $\mu\text{g/ml}$.

Dans le travail précité, nous avons remarqué deux autres points qui méritent également d'être signalés :

- d'une part, le fait que les auteurs indiquent que seule la forme l est dosée, la forme dl ne donnant que des réponses nettement inférieures et la forme d aucune réponse ; ceci corrobore ce que nous avons à maintes reprises mis en évidence (pp. 104-122) ;
- d'autre part, le fait qu'en utilisant, non plus la méthode par inhibition préalable de la croissance bactérienne, mais en employant une méthode directe, c'est-à-dire en utilisant une souche d'*Escherichia coli* dépendante, la sensibilité du dosage microbiologique est dix fois plus faible. En outre, les auteurs signalent que les zones de croissance sont nettement plus intenses dans le cas de la méthode par inhibition préalable.

Comparativement, en utilisant notre technique, nous avons pu doser le l-tryptophane dans des solutions en contenant de 5 à 20 $\mu\text{g/ml}$, donc sensiblement identiques à celles indiquées par M.F. MASTROPIETRO CANCELLIERI et G. MORPURGO ; le taux nécessaire en méthyl-5-tryptophane est de 5 à 10 mg %¹, tandis que les auteurs italiens préconisent un taux égal à 0,02 mM, soit 4,5 mg pour 100 ml.

Nous avons vérifié que d'autres acides aminés n'interféraient pas, en particulier la l-phénylalanine et la l-tyrosine, ces deux acides aminés ayant été notés par les auteurs italiens comme susceptibles d'empêcher l'action du méthyl-5-tryptophane, mais à des doses beaucoup plus élevées que celles observées pour le l-tryptophane.

(1) Il nous a été difficile de mieux préciser ce taux qui a varié d'une série d'essais à l'autre. Une explication plausible semble être les difficultés rencontrées pour solubiliser cet analogue.

Dans les conditions opératoires que nous préconisons, aucun des acides aminés suivants n'interfèrent :

- l-tyrosine
- l-phénylalanine
- l-valine
- l-leucine
- l-alpha-alanine
- l-glutamine
- l-histidine

Une remarque importante doit cependant être faite ; elle concerne la netteté des zones de croissance. Celles-ci ne sont pas aussi nettes que celles observées dans le dosage de la phénylalanine, de la méthionine, de la l-lysine et de la l-leucine. Nous avons essayé de pallier ce phénomène :

- soit en ensemençant moins (deux à cinq fois) ;
- soit en gélosant davantage (une fois et demie) ;
- soit en ajoutant du Tween 80 ;
- soit en combinant ces trois solutions ;
- soit en diminuant le taux en acide l-glutamique du milieu (deux fois moins) ;

sans toutefois parvenir à éviter une légère croissance dans l'ensemble du milieu. Une difficulté du même ordre a été rencontrée par BOLINDER et collaborateurs [79, 113] dans le dosage microbiologique de la l-lysine en utilisant *Streptococcus faecalis* ATCC 6057 lysine dépendante.

Nous avons indiqué, au chapitre relatif au dosage microbiologique de cet acide aminé et à celui consacré au dosage microbiologique de la leucine, que ces auteurs ont éliminé cette « croissance de base » en introduisant dans le milieu de culture de la dl-hydroxylysine et de la l-glutamine à des taux assez précis. Pour notre part, en appliquant les solutions techniques précitées, nous n'avons trouvé aucune amélioration.

b) Utilisation du méthyl-4-tryptophane :

Cet inhibiteur utilisé parallèlement au méthyl-5-tryptophane et à la même concentration, provoque une inhibition totale de la croissance de *Bacillus subtilis*, même si les concentrations en l-tryptophane des solutions sont nettement supérieures à celles indiquées lors de l'emploi du méthyl-5-tryptophane.

A un taux inférieur (deux fois moins) dans le milieu, il nous a été difficile d'obtenir des résultats reproductibles sans que nous puissions en avoir quelques explications.

III. — Résultats obtenus

En utilisant le méthyl-5-tryptophane comme analogue inhibiteur, nous avons obtenu les taux suivants :

Référence de l'échantillon	
NM 4	0,144 g ‰ (p/v)
NM 5	0,156 g ‰ (p/v)
NM 7	0,140 g ‰ (p/v)

Conclusion

Le méthyl-4-tryptophane et le méthyl-5-tryptophane ont été employés comme analogues inhibiteurs. La sensibilité de la méthode est inférieure à celle que nous avons observée pour la l-phénylalanine, la l-leucine et la l-méthionine. Il faut, en outre, ajouter que nous avons été gêné dans l'évaluation des zones de croissance par une inhibition de *Bacillus subtilis* dans l'ensemble du milieu d'essai, qui n'était que partielle.

Il faut donc rapprocher ce dosage de celui de la l-lysine ; néanmoins, nous avons pu ainsi déterminer la teneur en l-tryptophane de trois échantillons de Nuoc Mam, teneur non négligeable, que la méthode de séparation chromatographique suivie d'une évaluation spectrophotométrique, que nous avons utilisée, n'a pu nous permettre d'évaluer. De plus, nous avons ainsi prouver *a fortiori* la présence de l-tryptophane dans le Nuoc Mam.

Chapitre 15

Dosage microbiologique d'un acide 1-aminé basé sur le principe de l'inhibition préalable de la croissance d'une bactérie par un analogue de structure de cet acide aminé, la croissance étant suivie en milieu liquide

En 1962, CANCELLIERI MASTROPIETRO et PRINCIVALLE [48] publièrent un dosage microbiologique de l'adénine et de la guanine des acides ribonucléiques, les acides ribonucléiques étant au préalable hydrolysés par l'acide chlorhydrique. La méthode proposée a pour principe l'inhibition préalable de la croissance de *Bacillus megaterium* par l'aza-8-diamino-2.6-purine, l'inhibition étant dans un second temps levée par addition au milieu de culture d'adénine ou de guanine. Cette publication nous a intéressé non seulement par le fait qu'elle indique une méthode microbiologique basée sur le même principe que celle que nous proposons, mais également par le fait que les auteurs proposent deux variantes de la méthode :

- une technique par diffusion en milieu gélosé ;
- une technique turbidimétrique en milieu liquide.

Ce second point de vue a attiré notre attention. Nous avons donc pensé modifier la technique générale proposée page 67 pour effectuer les essais en milieu liquide. Les croissances bactériennes obtenues sont alors évaluées par photométrie à 650 nm après une incubation de quatorze à seize heures à 37°C.

Cependant, pour ne pas modifier sensiblement les caractéristiques de notre méthode, nous avons gardé le même milieu de culture, à

l'exception près que nous avons éliminé l'agar-agar. Les conditions de préparation et d'entretien de la souche de *Bacillus subtilis* ont été identiques à celles déjà explicitées.

Un inconvénient majeur a été cependant mis en évidence dès les premiers essais, ces essais concernaient le dosage de la l-phénylalanine. Bien qu'ayant situé les doses en l-phénylalanine susceptibles de donner dans les conditions opératoires des croissances bactériennes proportionnelles, nous avons été gêné, le plus souvent, par l'apparition au niveau de la zone aérobie stricte d'un voile difficilement dissociable et à notre avis faussant les résultats, malgré une agitation vigoureuse au moment des lectures photométriques.

Pour éviter la formation d'un voile, nous avons ajouté pour 100 ml de milieu de culture 0,2 ml de Tween 80 préalablement stérilisé par filtration sur membrane Millipore. Nous avons observé que la culture microbienne devenait beaucoup plus homogène, mais malheureusement les résultats obtenus n'ont pas été exactement fonction des taux en l-phénylalanine.

Dans une seconde série d'essais, tout en utilisant la même dose de Tween 80, nous avons diminué la teneur du milieu en bêta-thiényl-2-alanine, puis augmenté les valeurs de la gamme d'étalonnage. Ainsi le taux en inhibiteur a été amené à 0,5 mg pour 100 ml et la gamme étalon aux valeurs de 50, 60, 70, 80, 90 et 100 μ g de l-phénylalanine par ml de milieu d'essai. Certains résultats enregistrés nous ont donné satisfaction, comme le prouve le tableau ci-dessous :

Taux en l-phénylalanine	Essai n° 2	Essai n° 3
50 μ g/ml	D.O. 0,10	D.O. 0,170
60 μ g/ml	0,14	0,280
70 μ g/ml	0,29	0,330
80 μ g/ml	0,310	0,350
90 μ g/ml	0,370	0,370
100 μ g/ml	0,390	0,440

Cependant, à plusieurs reprises, tout en utilisant le même milieu et la même dose de Tween 80, nous avons constaté l'apparition d'un voile sans pouvoir toutefois en donner une explication plausible. Il faut noter que cet inconvénient majeur a été plus souvent remarqué pour les dilutions concernant le dosage de l'acide aminé dans le Nuoc Mam.

Devant cet échec, nous avons essayé d'utiliser deux autres substances tensioactives : le Triton X 100 et le Tergitol 7. Les essais

concernaient le dosage de la l-phénylalanine et le dosage de la l-méthionine. Dans le cas de la l-phénylalanine, le taux en inhibiteur et les valeurs de la gamme d'étalonnage sont identiques à ceux indiqués dans l'expérience précédente relative à l'emploi du Tween 80.

Dans le cas de la l-méthionine après des essais préalables, nous avons fixé le taux en l-méthionine-dl-sulfoximine à 1 μg par ml et les valeurs de la gamme d'étalonnage égales à 5, 10, 20, 30 et 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Le Triton X 100 et le Tergitol 7 ont dû être utilisés à des doses relativement faibles, soit 2 ml d'une solution au 1/2.000^e pour 100 ml de milieu. A des concentrations plus élevées, le Tergitol 7 et le Triton X 100 se sont montrés bactériostatiques dans les conditions opératoires retenues.

Quoi qu'il en soit, nous n'avons jamais obtenu de croissance bactérienne proportionnelle aux taux en l-méthionine ou en l-phénylalanine.

* *

En conclusion, il ne semble pas qu'il faille retenir les méthodes tubidimétriques pour évaluer la réapparition de la croissance bactérienne inhibée au préalable par un analogue d'un acide aminé, du moins en ce qui concerne l'utilisation d'une bactérie sporulée. Peut-être une agitation permanente du milieu d'essai aurait-elle résolu en partie les difficultés observées et permis d'obtenir un trouble homogène.

Pour notre part, nous pensons qu'une solution à ce problème serait d'envisager la culture de bactéries du genre *Escherichia* ou du genre *Lactobacillus*.

Dosages microbiologiques de certains composants de Nuoc Mam, utilisant une souche bactérienne dépendante du composant à doser

Dans le chapitre relatif aux inhibiteurs de la croissance des bactéries, nous avons rappelé que les méthodes microbiologiques utilisées pour le dosage des acides aminés ou des vitamines étaient basées sur l'emploi de souches bactériennes dépendantes. Toutes ces méthodes sont maintenant bien codifiées. Elles n'ont, à notre avis, qu'un inconvénient, c'est d'être délicates à exécuter et d'être ainsi fastidieuses.

Dans l'étude analytique du Nuoc Mam que nous avons faite, nous avons utilisé trois méthodes de dosage microbiologique basées sur ce principe. Les buts que nous propositions étaient cependant différents dans chacune des séries d'essais.

- La première série d'essais avait pour but de connaître la possibilité éventuelle d'employer *Escherichia coli* dépendant de la cyanocobalamine pour le dosage de l'activité vitaminique B12 du Nuoc Mam, compte tenu des taux en l-méthionine du Nuoc Mam que nous avons pu facilement évaluer.
- La seconde série d'essais a concerné l'emploi de souches de *Bacillus subtilis* dépendantes d'un acide aminé.
- La troisième série d'essais n'a été effectuée que pour déterminer la teneur en acide pantothénique du Nuoc Mam par une technique classique employant un lactobacille.

I. — Dosage microbiologique de la cyanocobalamine utilisant comme germe sensible *Escherichia coli* dépendant Importance de la présence de la l-méthionine

J. BRIGEAU évaluant l'activité vitaminique B12 des Nuoc Mam [200] en utilisant comme germe sensible *Escherichia coli* 113-3¹, avait souligné un point important relatif à la présence de méthionine, l'acide aminé interférant de façon sensible lors des dosages microbiologiques de la cyanocobalamine.

En effectuant la méthode des dilutions, J. BRIGEAU a prouvé que si le rapport méthionine/cyanocobalamine dans le Nuoc Mam est inférieur ou égal à 20.000, la technique de dosage turbidimétrique est applicable. Au-dessus de cette valeur, l'interférence de l'acide aminé devient trop importante pour que les résultats obtenus soient valables.

En utilisant comme germe dépendant *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797, on évite cet inconvénient, comme l'a prouvé l'auteur cité. Ainsi la teneur en cyanocobalamine des Nuoc Mam se situe autour de taux compris entre 50 m μ g/ml et 70 m μ g/ml.

La méthode microbiologique que nous avons décrite (p. 99), nous a permis de prouver que la teneur moyenne en l-méthionine des Nuoc Mam se situe entre 2,5 g et 2,8 g‰ ; à ce sujet, il est intéressant de remarquer que J. BRIGEAU, en éliminant la cyanocobalamine par hydrolyse alcaline et en tentant d'évaluer dans l'hydrolysât la méthionine par la méthode des dilutions et en utilisant *Escherichia coli* 113-3, indique des taux de 2 et 2,6 g/l, taux proches des nôtres.

Ainsi, compte tenu de nos résultats en l-méthionine et des taux en cyanocobalamine obtenus lors de l'utilisation de *Lactobacillus leichmannii*, on peut supposer que les rapports l-méthionine/cyanocobalamine varient entre 35.000 et 50.000 pour des taux retenus égaux à 50, 60, 70 m μ g/ml en cyanocobalamine et un taux moyen de 2,5 mg en l-méthionine/ml. Dans ces conditions, l'utilisation d'*Escherichia coli* risque de donner des résultats faussés systématiquement.

Nous avons cependant essayé de vérifier cette hypothèse en utilisant une méthode microbiologique basée sur l'emploi d'*Escherichia coli*/cyanocobalamine dépendante et effectuée en milieu gélosé.

J. BRIGEAU indique, dans sa thèse, un essai d'utilisation de la méthode de diffusion en milieu gélosé, en employant *Escherichia coli*. Comme nous disposions d'une méthode plus sensible mais basée sur le même principe, nous avons essayé de mettre en évidence l'effet d'une dilution préalable plus grande de l'échantillon à doser².

(1) Référence : Catalogue de l'Institut Pasteur de Paris sous le numéro 54.7.

(2) Sensibilité 25 fois supérieure.

La méthode de dosage microbiologique de la cyanocobalamine que nous avons utilisée permet de doser la vitamine B12 dans des solutions présentant des taux minima de l'ordre de 1,5 m μ g/ml, les solutions étalons titrant respectivement 10,5 et 2,5 m μ g/ml. Pratiquement, nous effectuons ce dosage avec le même matériel que celui indiqué page 75 (deux plaques de verre séparées par un cadre en acier inoxydable). Nous avons été obligé de diluer systématiquement le Nuoc Mam au 1/100^e et non au 1/2, comme c'est le cas dans la technique utilisée par J. BRIGEAU.

De plus, compte tenu d'un rapport théorique de l-méthionine/cyanocobalamine égal à 20.000, nous avons effectué une autre série de solutions étalons titrant par ml :

Solution E 1 :

- 10 m μ g de cyanocobalamine et
- 200 μ g de l-méthionine

Solution E 2 :

- 5 m μ g de cyanocobalamine et
- 100 μ g de l-méthionine

Solution E 3 :

- 2,5 m μ g de cyanocobalamine et
- 50 μ g de l-méthionine

L'ensemble des résultats obtenus figure dans le tableau ci-dessous :

	<i>Diamètre des zones de croissance bactérienne (en mm)</i>
Solution étalon cyanocobalamine (10 m μ g/ml) . .	16,5
Solution étalon cyanocobalamine (5 m μ g/ml) . . .	14,5
Solution étalon cyanocobalamine (2,5 m μ g/ml) .	12,5
Solution E 1	39,5
Solution E 2	28
Solution E 3	22
Echantillon NM 4 au 1/100 ^e	17
Echantillon NM 5 au 1/100 ^e	16
Echantillon NM 6 au 1/100 ^e	17,5
Echantillon NM 7 au 1/100 ^e	14

L'analyse du tableau nous permet de conclure :

a) Que la présence de l-méthionine à un taux 20.000 fois supérieur à celui de la cyanocobalamine fausse complètement tous les résultats, bien que nous ayons utilisé une technique plus sensible que celle de J. BRIGEAU.

A notre avis, et en fonction de nos essais concernant la l-méthionine, ce rapport de 20.000 est toujours inférieur à la réalité, si bien qu'en conclusion, nous pensons qu'il est nécessaire d'exclure systématiquement la technique microbiologique de dosage de la cyanobalamine utilisant *Escherichia coli*.

b) Que la méthode que nous avons employée exige une dilution préalable au 1/100^e de Nuoc Mam; malgré ce taux de dilution, nous obtenons des réponses ininterprétables et laissant supposer une teneur en cyanobalamine le plus souvent supérieure à 1 µg/ml, ce qui paraît invraisemblable.

Enfin, comme J. BRIGEAU, nous avons noté une double zone de croissance, à l'exception toutefois du Nuoc Mam référencé NM 7 qui n'a présenté qu'une seule zone de croissance. Or, cet échantillon est celui qui a présenté le taux en l-méthionine le moins élevé.

II. — Essais concernant l'emploi de souches de *Bacillus subtilis* dépendantes d'un acide aminé

Nous avons eu à notre disposition quatre souches de *Bacillus subtilis* référencées¹ :

S. 340/366	Histidine dépendante
PA II B/366	Phénylalanine indépendante
6051 202 5.4.65	Tyrosine dépendante
S 487	Proline dépendante

Toutes ces souches étaient lyophilisées sous la forme de spores et ainsi prêtes à l'emploi.

Nous les avons utilisées soit directement, soit après divers repiquages effectués dans le but de les conserver et d'obtenir un matériel plus important.

La dépendance de ces souches a été obtenue par des cultures successives sur des milieux dont la composition est fonction de l'acide aminé à doser et par exposition à des rayons X et ultra-violets selon des modalités qui ne nous ont pas été communiquées.

(1) Nous tenons à remercier R. GUTHRIE qui a bien voulu nous procurer ces souches.

1) *Utilisation directe des spores lyophilisées :*

La composition des milieux utilisés, les modalités d'ensemencement ont été identiques à celles décrites dans la technique générale basée sur le principe de l'inhibition préalable de la croissance de la bactérie (p. 67). Les solutions des acides aminés étaient dosées à 5, 10 et 20 mg pour 100 ml et les dépôts des solutions sur le milieu gélosé d'essai ont été effectués à l'aide de disques.

Aucun résultat interprétable n'a été obtenu. Nous n'avons pu cependant continuer cette série d'essais, n'ayant à notre disposition qu'un nombre limité d'échantillons de chaque souche. Nous avons donc pensé cultiver ces souches pour les conserver et obtenir en définitive un nombre plus grand de spores permettant de multiplier les essais en vue d'une technique adéquate. En agissant ainsi, nous nous sommes inspiré des méthodes utilisées pour la conservation des souches de lactobacilles ou de streptocoques dépendantes d'un acide aminé ou d'une substance à activité vitaminique.

2) *Obtention secondairement de spores après culture de Bacillus subtilis :*

Nous avons donc été amené à poursuivre cette étude en utilisant la souche dépendante de *Bacillus subtilis* cultivée au préalable par nous-même.

Dans un premier temps, nous avons cultivé les souches précitées sur un milieu gélosé ordinaire pH 7-7,2. L'avant-veille de l'essai, nous avons ensemencé une anse de cette culture dans un bouillon de composition définie, ayant la formule suivante :

— Phosphate dipotassique	7 g
— Phosphate monopotassique	3 g
— Sulfate de magnésium	0,1 g
— Citrate de sodium trisodique	0,5 g
— Asparagine	3 g
— Tryptophane	0,2 g
— Acide glutamique	0,004 g
— Arginine	0,004 g
— Glycocolle	0,004 g
— Acide aminé à doser	0,004 g
— Glucose	10 g
Eau distillée, q.s.p.	1.000 ml

Au bout de vingt-quatre heures d'incubation à 37°C, la culture obtenue a été centrifugée et le culot de bacilles lavé cinq fois de suite avec une solution de chlorure de sodium titrée à 9 g %. Finalement, les bacilles ont été remis en suspension dans la même solution

et sous un volume identique à celui du bouillon ayant servi à la préculture de vingt-quatre heures. La suspension a été traitée comme il est indiqué page 71, en vue d'obtenir uniquement la forme sporulée.

Deux milieux d'essai différents ont été alors utilisés pour le dosage :

- le milieu que nous préconisons dans la technique générale, page 67 ;
- un milieu gélosé identique à celui de la préculture en bouillon, à l'exception près d'une teneur en gélose de 10 g‰ et de l'absence de l'acide aminé à doser.

L'emploi du milieu décrit dans la technique générale s'est soldé systématiquement par des échecs, soit que nous ayons eu l'absence totale de croissance bactérienne, soit que nous ayons eu une croissance bactérienne dans l'ensemble du milieu sans exaltation au niveau des disques, ceci en fonction des teneurs en acides aminés des solutions, teneurs qui ont varié de 10 à 200 mg‰.

Par contre, l'emploi du second milieu nous a donné, dans le cas des souches de *Bacillus subtilis* tyrosine et proline dépendantes, des croissances bactériennes fonction des taux en tyrosine ou en proline, taux de 25, 50, 75 et 100 µg/ml. Les résultats obtenus ont été confirmés deux fois.

Cependant, après les repiquages successifs nécessaires pour conserver la souche sur milieu gélosé, la dépendance de la souche vis-à-vis de l'acide aminé a disparu.

En conclusion, les difficultés de maintenir une souche de *Bacillus subtilis* dépendante d'un acide aminé nous a décidé à abandonner une méthode de dosage basée sur ce principe.

Peut-être serait-il souhaitable d'avoir à sa disposition des spores lyophilisées de la souche dépendante de l'acide aminé, ces spores étant prêts à l'emploi. Ceci éviterait l'entretien d'une souche qui a pour conséquence la perte rapide de la dépendance. Il faudrait cependant reconsidérer l'utilisation de ces spores et, sans aucun doute, modifier le milieu que nous avons proposé dans la méthode générale.

Dosage de l'acide panthoténique

Nous avons dosé l'acide panthoténique par la méthode microbiologique utilisant comme germe dépendant le *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 et comme milieu de culture celui décrit dans l'A.O.A.C. [201].

La lecture des résultats a été effectuée turbidimétriquement en cuve de 1 cm à 650 nm.

Trois échantillons de Nuoc Mam ont été ainsi analysés. Les résultats obtenus sont les suivants. Ils sont exprimés en gramme de sel de sodium pour 1.000 ml :

<i>Référence de l'échantillon</i>	
NM 4	0,272 g ‰ (p/v)
NM 5	0,250 g ‰ (p/v)
NM 7	0,100 g ‰ (p/v)

Conclusion générale

L'étude analytique que nous avons entreprise sur le Nuoc Mam a eu pour principal objet la composition en acides aminés de ce protéolysat naturel. Cette étude a été effectuée selon deux points de vue : l'un qualitatif, l'autre quantitatif.

Au préalable, deux séries d'essais ont eu pour but, d'une part une identification éventuelle des bactéries présentes dans cette solution hypersalée, d'autre part l'élimination du chlorure de sodium.

L'utilisation des membranes filtrantes, lors de l'étude bactériologique, nous a seulement permis de prouver que, dans un milieu aussi riche en électrolytes, des bactéries aérobies étaient susceptibles de survivre. Il nous fut impossible de mettre en évidence, par cette technique, des bactéries anaérobies sulfito-réductrices dont la présence paraît être logique, compte tenu des modalités de préparation relatives au Nuoc Mam.

L'élimination du chlorure de sodium nous a paru soulever des problèmes intéressants. A notre avis, les techniques couramment préconisées, insolubilisation par un solvant organique, analyse et dessalage électrolytique, ne sont pas, pour le cas présent, des solutions satisfaisantes. Tantôt l'élimination des électrolytes est insuffisante pour permettre une étude quantitative des acides aminés selon le procédé de MOORE et STEIN adapté à une dialyse automatique, tantôt cette élimination a pour conséquence une perte importante en acides aminés. De plus, nous avons pu prouver que l'emploi d'un dessaleur à cathode de mercure, dont l'usage se répand de plus en plus, présente l'inconvénient d'introduire dans la solution des complexes mercuriels dont l'activité bactériostatique ne doit pas être négligée, quand on envisage ultérieurement la détermination d'un acide aminé par une méthode microbiologique.

L'étude qualitative de la composition en acides aminés du Nuoc Mam a été effectuée pour compléter les travaux antérieurs décrits

à ce sujet, en utilisant des méthodes soit plus récentes comme la chromatographie électrophorèse, soit plus spécifiques d'un groupe d'acides aminés et de leurs métabolites classiques. Cette étude nous assurait l'identification des acides aminés que nous nous proposons de doser par une méthode microbiologique dont il est question plus loin. Elle nous a permis de mettre en évidence la leucine et l'isoleucine et ainsi de nous expliquer les difficultés rencontrées dans le dosage microbiologique de la l-leucine.

Nous avons pu ainsi prouver la présence de peptides, tandis que nous nous sommes aperçu que des très nombreux métabolites du tryptophane susceptibles d'être révélés par la méthode chromatographique de JEPSON, seule la tryptamine a pu être mise en évidence. De même, seule l'histamine parmi les métabolites de l'histidine a pu être identifiée.

Parmi les méthodes utilisées, la chromatographie électrophorèse nous a permis une séparation des acides aminés plus aisée, la teneur élevée en chlorure de sodium des Nuoc Mam n'interférant pas.

L'analyse quantitative des acides aminés revêt, dans le travail que nous présentons, une plus grande importance.

Pour ce faire, nous avons utilisé d'une part des méthodes physico-chimiques, d'autre part une méthode microbiologique originale très différente dans son principe des méthodes microbiologiques classiques utilisant des souches bactériennes dépendantes de l'acide aminé, que l'on se propose de doser.

Parmi les méthodes physico-chimiques, certaines sont classiques. Elles consistent en une séparation chromatographique ou électrochromatographique préalable sur un support solide, suivies d'une élution après réaction avec la ninhydrine. L'éluat ainsi coloré est alors évalué photométriquement. En utilisant une méthode électrophorétique, nous avons pu ainsi évaluer la teneur du Nuoc Mam en acide aspartique et en acide glutamique, la teneur en acide glutamique présentant pour nous une importance capitale lors de l'application de la méthode microbiologique en vue du dosage de la l-méthionine.

Parmi des méthodes physico-chimiques récentes, nous avons utilisé deux techniques fluorimétriques spécifiques de la tyrosine et de la phénylalanine. Nous avons pu réaliser ainsi une étude comparative entre la méthode microbiologique proposée pour la l-phénylalanine et la méthode fluorimétrique relative à cet acide aminé.

L'analyse quantitative de certains acides aminés nous a amené à établir une méthode microbiologique générale basée sur l'utilisation d'un inhibiteur de la croissance d'une bactérie. L'inhibiteur est en fait un analogue de structure de l'acide aminé que l'on veut doser et son

activité inhibitrice peut être annulée ou retardée par la présence de cet acide aminé, ceci quantitativement en fonction des taux en acide aminé présent.

La méthode proposée est une méthode par diffusion, l'analogue inhibiteur étant introduit au préalable dans le milieu de culture semencé, tandis que l'acide aminé est déposé sur le milieu de culture à l'aide de disques selon le procédé classique utilisé dans l'évaluation de l'activité biologique des antibiotiques ou de certaines vitamines dont la cyanocobalamine.

Délibérément, nous avons abandonné les méthodes microbiologiques classiques faisant appel à une souche bactérienne dépendante de l'acide aminé, le plus souvent appartenant au genre *Lactobacillus* et au genre *Streptococcus*.

La méthode que nous proposons permet l'emploi d'un milieu de culture de composition extrêmement simple, ce qui n'est pas le cas des méthodes classiques citées plus haut.

Une autre caractéristique de cette méthode réside dans l'utilisation d'une bactérie aérobie sporulée, *Bacillus subtilis*. Il semble que la plupart des souches de *Bacillus subtilis* conviennent parfaitement à cet usage. Ceci est un grand avantage, car l'entretien de cette souche est des plus aisés et peut être réalisé sur un milieu gélosé classique. L'entretien des *Lactobacilli* et des *Streptococci* dépendants demande au contraire des milieux définis et des repiquages précis. De plus, la suspension de spores de *Bacillus subtilis*, qui est en réalité la forme d'emploi de la bactérie, peut être conservée un temps très long, ceci exclut toute revitalisation préalable de la souche avant la détermination microbiologique.

Cependant ce serait une erreur de penser que seul *Bacillus subtilis* doit être retenu pour un dosage microbiologique basé sur ce principe.

Nous avons pu prouver que d'autres bacilles aérobies sporulés, comme *Bacillus cereus* et *Bacillus megaterium* pouvaient être envisagés. Il est hors de doute que *Escherichia coli*, qui se prête bien aux méthodes microbiologiques par diffusion, pourra être utilisé. Certains essais que nous avons effectués, mais non relatés dans le présent travail, nous le laissent supposer. Il faut cependant ajouter que, dans le cas de ce bacille, la spécificité de souche semble exister, du moins à un certain degré¹.

(1) Des résultats très satisfaisants ont été obtenus en employant lors du dosage de la l-leucine, *Escherichia coli* 111 B4. Les valeurs des solutions étalons et la teneur en inhibiteur du milieu d'essai sont celles indiquées dans le chapitre relatif à la leucine. Pour parfaire la lecture des zones de croissance, nous avons ajouté au milieu de culture pour 100 ml, 100 mg de chlorure de triphényltétrazolium et 5 mg de bleu de bromophénol. Les essais ont été effectués à 27°C.

La méthode que nous proposons a aussi l'intérêt d'être de réalisation facile, ce qui n'exclut pas une bonne reproductibilité dans les résultats et ce qui lui donne un avantage certain sur les méthodes turbidimétriques utilisant des souches dépendantes que certains auteurs ont qualifiées quelquefois de fastidieuses.

En réalité, un seul facteur devient essentiel dans la méthode proposée : le choix de l'analogue inhibiteur. Ce choix est basé sur non seulement une activité inhibitrice relative à la croissance bactérienne, mais également sur l'aptitude de l'acide aminé à provoquer la réapparition de cette croissance, ce, à des concentrations les plus faibles possibles pour permettre une bonne sensibilité de la méthode.

Il faut souligner le fait important que la liste des analogues de structure des acides aminés susceptibles d'être utilisés ne fait que croître en fonction des possibilités plus grandes de la synthèse organique. Il est certain que les travaux qui ont pour but l'étude des antimétabolites auront pour résultats, dans le cas précis qui nous préoccupe, d'allonger cette liste, d'autant que l'étude des antimétabolites est souvent réalisée au niveau du métabolisme des bactéries.

Comme dans le cas des méthodes classiques, la méthode proposée permet le dosage de la forme l de l'acide aminé et non celui de la forme d. Elle évalue une fraction de la forme dl. Nous avons explicité ce point de vue dans l'application de la méthode à des protéolysats médicamenteux ou à des aliments hydrolysés.

Cependant, il serait vain de sous-estimer quelques inconvénients que nous avons pu remarquer lors de l'emploi de cette méthode :

- Tout d'abord, en utilisant comme réactif des analogues de structure d'acides aminés, il ne faut pas sous-estimer deux points de vue. Le premier est que la plupart des antimétabolites sont des substances d'un coût relativement élevé. Le second est qu'il est parfois difficile de se les procurer, leur synthèse pouvant, pour des raisons les plus variées, être définitivement suspendue.
- Ensuite, nous avons pu prouver que l'antagonisme entre l'analogue de structure et l'acide aminé risque parfois d'être fortement modifié par la présence simultanée d'un autre acide aminé. Ce fut le cas de la leucine et de l'isoleucine. Il est donc nécessaire d'effectuer au préalable des essais qui n'ont pas seulement pour but de remarquer le caractère additif d'un acide aminé dont l'activité va s'ajouter à celle de l'activité de l'acide aminé que l'on veut doser. Également, il faut se rendre compte de l'inhibition éventuelle sur la croissance bactérienne que peut provoquer un acide aminé présent dans un protéolysat dont on se propose de doser un des acides aminés.

— Enfin pour les six acides aminés que nous avons pu évaluer dans le Nuoc Mam ou dans des protéolysats médicamenteux par cette méthode microbiologique, nous nous sommes aperçu que la « qualité » de la croissance de *Bacillus subtilis*, c'est-à-dire la netteté des zones de croissance autour des disques, n'était pas toujours la même. Ainsi les réponses les plus nettes ont été obtenues lors du dosage de la l-histidine, de la l-leucine, de la l-méthionine et de la l-phénylalanine. Par contre, lors de l'évaluation de la l-lysine et du l-tryptophane, nous avons remarqué dans l'ensemble du milieu de culture une inhibition seulement partielle de la croissance bactérienne rendant moins aisée la lecture des résultats. Pour éviter cette « croissance » de base », il nous a fallu augmenter la concentration en inhibiteur, augmentation qui a eu pour conséquence une diminution de la sensibilité de la méthode.

Vu, le Président de Thèse :
S. LAMBIN

Vu, le Doyen :
P. MALANGEAU

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
J. ROCHE

Bibliographie

1. BOETZ et GUILLERM. — Le facteur microbien dans la fabrication de la saumure indochinoise (Nuoc Mam). (*C.R. Acad. Sci.*, 1930, **190**, 534.)
2. BOETZ et GUILLERM. — Pouvoir protéolytique de la flore anaérobie de la saumure indochinoise (Nuoc Mam). (*C.R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1054.)
3. ROSE (E.). — Le Nuoc Mam (eau de poisson salé), condiment national indochinois. (*Bull. Sci. Pharm.*, mai-juin 1920, t. XXVII.)
4. ROSE (E.). — Recherche sur la fabrication et la composition chimique du Nuoc Mam. (*Bull. Econ. Indochine*, 1918, **129**, 155.)
5. ROSE (E.). — Le Nuoc Mam du Nord. Composition chimique et fabrication. (*Bull. Econ. Indochine*, 1918, **132**, 955.)
6. GUILLERM (J.). — Le Nuoc Mam et l'industrie saumurière en Indochine. (*Arch. Inst. Pasteur Indochine*, 1928, **7**, 21.)
7. GUILLERM (J.). — L'explication scientifique d'un phénomène empirique : la production du Nuoc Mam. (*C.R. VIII^e Congrès F.E.A.T.M.*, Bangkok, 1930, **1**, 122.)
8. GUILLERM (J.) et VIALARD GOUDOU (A.). — Fabrication, définition et réglementation de la sauce de poisson vietnamienne Nuoc Mam. (*Trans. Eight Pacific Sci. Congr.*, Manille, 1953.)
9. CHAT (Trân Lê). — La pêche aux poissons et la fabrication du Nuoc Mam (saumure) dans les côtes de l'Annam. (Marseille, Imp. Soc. du *Petit Marseillais*, 1922.)
10. KHUONG (Nguyen Luong). — Etudes sur les techniques de pêche du Vietnam (note sur la fabrication de la cuve à Nuoc Mam de Nhatrang). (Extrait du *Bull. Soc. Etudes Indochinoises*, nouv. série, 1952, t. XXVII, n° 1, p. 33.)

11. MESNARD et ROSE (E.). — Recherches complémentaires sur la fabrication du Nuoc Mam. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1920, **34**, 622.)
12. PEIRRIER (J.C.) et NGUYEN KIM KINH. — Dosage rapide des acides aminés et des polypeptides dans le Nuoc Mam. (*Ann. des Falsifications et des Fraudes*, Paris, 26^e année, 1933, 289.)
13. BLASS (J.) et RICHARD (L.). — Etudes du Nuoc Mam par microchromatographie. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 791.)
14. VIALARD GOUDOU (A.). — Etude chimique de la saumure indochinoise le Nuoc Mam. Recherche et caractérisation de quelques produits de dégradation : acide butyrique, acide lactique, dérivés de l'imidazol (histamine) et tyramine. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1942, **20**, 960.)
15. TRUONG VAN CHOM. — Les acides volatils du Nuoc Mam. (*Acta Medica Vietnamica*, 1957, **1**, 23.)
16. NGUYEN AN CU et VIALARD GOUDOU (A.). — Sur la nature de l'acidité volatile de la saumure vietnamienne Nuoc Mam. (*C.R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 128.)
17. NGUYEN VAN DHIN. — Note de laboratoire sur la recherche de l'alcool et des aldéhydes dans le Nuoc Mam. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1944, **22**, 345.)
18. COUSIN (E.) et NGUYEN VAN DHIN. — Note de laboratoire sur la recherche de l'acide folique et de l'alcool méthylique dans le Nuoc Mam. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1944, **22**, 738.)
19. VAN VEEN. — On volatile aromatic substances from certain fish products. (*Natuur. Tijdsch. V. Ned. Ind.*, 1941, **101**, 147.)
20. VAN VEEN. — Fish preservation in South East Asia. (*Advances in Food Research*, 1953, **4**, 209.)
21. TRUONG VAN CHOM. — Contribution à l'étude du Nuoc Mam. (Faculté de Marseille, 1954.)
22. GUILLERM (J.). — L'industrie du Nuoc Mam en Indochine. (*Arch. Inst. Pasteur d'Indochine*, 1928, 4^e année, **2**, n^o X.)
23. VIALARD GOUDOU (A.) et DANG VAN TIEN. — Les composants minéraux du Nuoc Mam ; soufre minéral et soufre organique. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1940, **18**, 547.)
24. VIALARD GOUDOU (A.). — Les composants minéraux de la saumure indochinoise Nuoc Mam, calcium, magnésium, fer. (*Rev. Franç. d'E.O.*, 1941, **19**, 588.)
25. COUSIN (E.) et NGUYEN VAN DINH. — Le brome et l'iode du Nuoc Mam. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1944, **22**, 408.)

26. COUSIN (E.) et DANG VU KHA. — Les infiniments petits chimiques du Nuoc Mam. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1944, **22**, 413.)
27. RICHARD (C.) et VIALARD GOUDOU (A.). — Le fluor dans les eaux du Sud-Vietnam et les plateaux montagnards du Sud. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, **36**, 901.)
28. *Pharmacopée Française*, 1965, 8^e édition.
29. *J. Officiel* du 15 mars 1960. Circulaire ministérielle en date du 21 janvier 1960. Texte d'intérêt général.
30. GHADIMI (J.), M.D., PARTINGTON (N.W.), M.B., Ph.D., M.R.C.P. (Edin) and HUNTER (A.), M.B., T.R.S.C. — Inborn error of histidine metabolism. (*Pediatrics*, 1962, **29**, 714.)
31. BISERTE (G.), DAUTREVAUX (M.), PAYSANT (P.). — La chromatographie électrophorèse des acides aminés et des peptides. (*Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1963, **12**, 2954.)
32. BISERTE (G.), PAYSANT (P.), BOULANGER (P.). — Chromatographie de partage sur papier des acides aminés urinaires. (*Path. Biol.*, 1959, **7**, 1529.)
- 32 bis. CONSDEN (R.), GORDON (A.H.) and MARTIN (J.P.). — Ionophoresis in silica jelly. A method for the separation of amino-acids and peptides. (*Biochem. J.*, 1946, **40**, 33.)
33. VIALARD GOUDOU (A.). — Etude chimique de la saumure indochinoise Nuoc Mam. Recherche et dosage de l'acide indol-bêta-acétique. (*Rev. Méd. Franç. d'E.O.*, 1943, **21**, 879.)
34. VIALARD GOUDOU (A.). — Le Nuoc Mam ou sauce de poisson vietnamienne. (*Prod. Pharm.*, 1962, **424**, 17, 9.)
35. LEGROUX (R.), LIVADITI (J.C.), BOVET (G.). — Présence d'histamine dans le Nuoc Mam conservé au laboratoire. (*C.R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 864.)
36. SARRAF (A.). — Recherche sur les aminés de décarboxylation produite par une bactérie anaérobie : *Inflabis lacustris*. (Thèse, Université de Paris, 1960.)
37. JEPSON (J.B.). — Paper chromatography of urinary indoles. (*Lancet*, 1955, II, 1009.)
38. AUERBACH (V.H.), DIGEORGE (A.M.), BALDRIDGE (R.C.), TOURTELLOTTE (C.D.) and PRINCE BRIGHAM (M.). — Histidinemia. A deficiency in histidase resulting in the urinary excretion of histidine and of imidazole pyruvic acid. (*J. Pediatr.*, 1962, **60**, 487.)
39. NORDMANN (J.) and NORDMANN (R.). — Organic acids. In J. SMITH, Chromatographic and electrophoretic techniques. (N.Y., U.S.A., Interscience Publ. Inc.)

40. ZALUSKY (R.) and HERBERT (V.). — Urinary figlu as test of folic acid deficiency. (*Lancet*, 1962, **1**, 7220, 108.)
41. TROLL (W.) and LINDSLEY (J.). — A photometric method for the determination of proline. (*J. Biol. Chem.*, 1955, **215**, 655.)
- 41 bis. BOREL (J.P.), CARANJOT (J.M.), JAYLE (M.F.). — Une méthode de fractionnement des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline. (*Clin. Chim. Acta*, 1967, **16**, 409.)
42. LA DU (B.M.), MICHAEL (P.J.), BETHESDA (B.A.). — An enzymatic spectrophotometric method for the determination of phenylalanine in blood. (*J. Lab. and Clin. Med.*, 1960, **55**, 491.)
43. WAALKES (T.P.) and UDNENFRIEND (S.J.). — A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissus. (*J. of Lab. and Clin. Med.*, 1957, **50**, 733.)
44. POLSON (A.). — Quantitative partition chromatography and the composition of *E. coli*. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1948, **2**, 575.)
45. STEIN (W.) and MOORE (S.). — Chromatography of amino acids on starch columns. Separation of phenylalanine ; leucine, isoleucine, methionine, tyrosine and valine. (*J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 337.)
- 45 bis. CERIOTTI (G.) and SPANDRIO (L.). — Catalytic acceleration of the ureadiacetylmonoxime-phenazone reaction and this application to automatic analysis. (*Clin. Chim. Acta*, 1965, **11**, 519.)
46. THIVOLLE (L.) et SONTAG (G.). — Guide des travaux pratiques de chimie biologique, par A. Roche et C. Dumazert, Ed. M. Declume, Lons-le-Saunier, 1942, 36.
47. LEMONNIER (A.) et LELUC (R.). — Clearance de la créatinine endogène. In E. FAUVERT et L. HARTMANN, Techniques modernes de laboratoire. (Paris, L'Expansion édit., 1961-1962.)
48. CANCELLIERI MASTROPIETRO (M.F.) and PRINCIVALLE (M.). — New microbiological assay method of adenine and guanine for the determination of deoxyribonucleic acid. (*R.C. Ist. Sup. Sanita. Ital.*, 1962, **25**, VII, VIII, IX, 437.)
49. ROBLIN (R.O.), LAMPEN (J.O.), ENGLISH (J.P.), COLI (Q.R.) and VANGHAN (J.R.). — Studies in chemotherapy. VIII. Methionine and purine antagonists and their relation to the sulfonamides. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 290.)
50. CARTER (D.W.), SYKES (G.). — The microbiological assay of mercurials in pharmaceutical products. (*Analyst.*, 1968, **83**, 536.)

51. STEIN (W.) and MOORE (S.). — Chromatography of amino acids on starch columns. Solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. (*J. Biol. Chem.*, 1949, **178**, 53.)
52. MOORE (S.) and STEIN (W.). — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. (*J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 663.)
53. MOORE (S.) and STEIN (W.). — Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. (*J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 893.)
54. MOORE (S.), SPACKMANN (D.H.) and STEIN (W.H.). — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. (*Anal. Chem.*, 1958, **30**, 11, 1185.)
55. DELARUE (J.C.). — Chromatographie des amino-acides sur résine échangeuse d'ions. Modification proposée de la méthode de Padieu et Meleknia. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1966, **48**, 364.)
56. PADIEU (P.) et MELEKNIA (M.). — Sur un nouveau système de tampons volatils pour la chromatographie des acides aminés sur résine échangeuse de cations. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 493.)
57. BERNARD (J.). — Contribution à l'étude analytique des protéolysats injectables. (*Ann. Pharm. Franç.*, 1967, **25**, 89.)
58. GUTHRIE (R.). — *J. Am. Med. Association Letters*, 1961, 178-863.
59. GUTHRIE (R.). — Proposal to the children's Bur., janvier 1962.
60. GUTHRIE (R.). — U.S. Dept. Health Education and Welfare. Children's Bur., Feb. 5, 1962.
61. KAVANAGH. — Analytical microbiology. (Academic Press, 1963.)
62. RICHMOND (M.H.). — The effect of aminoacid analogs on growth and protein synthesis in microorganism. (*Bact. Rev.*, 1962, **26**, 398.)
63. MEISTER (A.). — Amino acid antagonists. In *Biochemistry of the amino-acids*, seconde éd., 1965, **1**, 231.
64. BAKER (R.S.), JOHNSON (J.E.) and FOX (S.W.). — Incorporation of p.fluorophenylalanine into proteins of *Lactobacillus arabinosus*. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1958, **28**, 318.)
65. YOSHIDA (A.). — Studies on the mechanism of protein synthesis bacterial alpha-amylase containing ethionine. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **29**, 213.)
66. HANSSON (E.) and GARZO (T.). — Amino acid analogue incorporation intopancreatic juice proteins *in vivo*. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 121.)

67. FOX (S.W.), FLING (M.) and BOLLENBACK (G.N.). — Inhibition of bacterial growth by d-leucine. (*J. Biol. Chem.*, 1944, **155**, 465.)
68. HOPPS (H.E.), WISSEMAN (Cl.), HAHN (F.E.), SMADEL (J.E.) and Ho (R.). — Mode of action of chloramphenicol. IV. Failure of selected natural metabolites to reserve antibiotic action. (*J. Bact.*, 1956, **72**, 561.)
69. MASTROPIETRO CANCELLIERI (M.F.) and MORPURGO (G.). — A new microbiological method for amino acid assay. (*Sc. Rept. Ist. Super Sanita*, 1962, **2**, 336.)
70. FERGER (M.F.) and Du VIGNEAU (V.). — The microbial growth inhibition produced by optical isomers of bêta-2-thienylalanine. (*J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 241.)
71. COWIE (D.). — *In Carnegie Institution of Washington Year Book*, 1959, **58**, 294.
72. RICHMOND (M.H.). — Immunological properties of exopenicillinase synthesized by *Bacillus cereus* 569/H in the presence of amino acid analogues. (*Biochem.*, 1960, **77**, 112.)
73. RICHMOND (M.H.). — Incorporation of dl-beta (p.fluorophenyl) beta-14-C alanine into exopenicillinase by *Bacillus cereus* 569/H. (*Biochem. J.*, 1960, **77**, 121.)
74. SHRIFT (A.). — Sulfur-selenium antagonism. II. Antimetabolite action of seleno-methionine on the growth of *Chlorella vulgaris*. (*Am. J. Botany*, 1954, **41**, 345.)
75. SHIOTA (T.), MAURON (J.) and FOLK (J.E.). — Inhibition of lysine and lysine peptide, utilisation in bacteria by peptides of S-(beta-aminoethyl) cysteine. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1961, **53**, 360.)
76. MCCORD (J.T.), RAVEL (J.M.), SKINNER (C.G.) and SHIVE (W.). — O-carbazyl-dl-serine an inhibitory analog of glutamine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 3762.)
77. MCCORD (T.J.), COOK (D.E.) and SMITH (L.G.). — The synthesis and biological activities of some aza analogs of amino acids. II. 4-azalysine, an inhibitory analog of lysine. (*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1964, **105**, 349.)
78. SMITH (S.S.), BAYLISS (L.N.), MCCORD (T.J.). — The synthesis and biological activities of some aza analog of amino acids. I. 4-azaleucine, an inhibitory analogs of leucine. (*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1963, **102**, 313.)
79. BOLINDER (A.E.), LIE (S.) and ERICSON (L.E.). — Plate assays methods for aminoacids. 2. Factors affecting the cup plate assay for lysine with *Streptococcus faecalis* ATCC 6057. (*Biotech. Bioeng.*, 1963, **V**, 147.)

80. GUTHRIE (R.), SUSI (A.). — A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large population of newborn infants. (*Pediatrics*, 1963, **31**, 338.)
81. GUTHRIE (R.), WHITNEY (S.). — Phenylketonuria detection in the newborn infant as a routine hospital procedure. (*Children's Bureau Publication*, U.S. Dept. of Health Education and Welfare, 1964, 419.)
82. GUTHRIE (R.). — Routine screening for inborn errors in the newborn ; inhibition essays. Instant bacteria and multiple tests. (*International Congress on Mental Retardation*, Copenhagen, 1964, **2**, 495.)
83. MOYED (H.S.). — Interference with the feed back control of histidine biosynthesis. (*J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, III, 2261.)
84. JONES (R.G.) and AINSWORTH (C.). — 1, 2, 4-triazole-3-alanine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1, 1538.)
85. LANDSFORD (E.M.) and SCHIVE (W.). — Growth inhibition by some beta-arylalanines. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **38**, 347.)
86. SMITH (S.S.), BAYLISS (L.N.), McCORD (T.J.). — The synthesis and biological activities of some aza analogs of amino acids. I. 4-azaleucine, an inhibitory analog of leucine. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, **102**, 313.)
87. ROBINSON (M.W.) and ROBINSON (B.L.). — 7-azaindole. I. Synthesis and conversion to 7-azatryptophan and other derivatives. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1, 457.)
88. PARDEE (A.B.) and PRESTIDGE (L.S.). — Effect of azatryptophane on bacterial enzyme and bacteriophage. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1958, **27**, 330.)
89. KIDDER (G.W.) and DEVEY (V.C.). — Inhibition of tetrahymena by a new tryptophan analog. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 288.)
90. NORTON (S.J.), SKINNER (C.G.) and SHIVE (W.). — DL-5-hydroxy-2-pyridinealanine, a tyrosine analog. (*J. Org. Chem.*, 1961, **26**, II, 1495.)
91. McCORD (T.J.), COOK (D.E.) and SMITH (L.G.). — The synthesis and biological activities of some aza analogs of amino acids. II. 4-azalysine an inhibitory analog. of lysine. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, **105**, 349.)
92. WESTLEY (J.) and CEITHAML (J.). — Synthesis of histidine in *E. coli*. I. Biochemical mutant studies. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, **60**, 215.)

93. AMES (B.N.), GARRY (B.) and HERZENBERG (L.A.). — The genetic control of the enzymes of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. (*J. Gen. Microbio.*, 1960, **22**, 369.)
94. NEIDLE (A.) and WAELSCH (H.). — Participation of glutamine in the biosynthesis of histidine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 1, 767.)
95. NEIDLE (A.) and WAELSCH (H.). — The origin of the imidazol ring of histidine in *Escherichia coli*. (*J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, I, 586.)
96. VOGEL (H.J.), DAVIS (B.D.), MINGIOLI (E.S.). — 1-histidinol, a precursor of 1-histidine in *Escherichia coli*. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 2, 1897.)
97. EDELSON (J.), PAL (P.R.), SKINNER (C.) and SHIVE (W.). — Synthesis of 2-cyclopentane-1-glycine and 1-cyclohexane-1-alanine inhibitory amino acid analog. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, IV, 5209.)
98. PAL (P.R.), SKINNER (C.G.), DENNIS (R.L.) and SHIVE (W.). — Cyclopentanealanine and 1-cyclopentane-1-alanine, inhibitory analogs of leucine and phenylalanine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, III, 5116.)
99. EDELSON (J.), SKINNER (C.G.), RAVEL (J.M.) and SHIVE (W.). — Structural specificity of some amino acids antagonists. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, IV, 5150.)
100. DITTMER (K.). — The structural bases of some amino-acid antagonists and their microbiological properties. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1950, **52**, 1274.)
101. GUTHRIE (R.). — *Communication au XI^e Congrès de Pédiatrie*, Tokyo, 7-13 novembre 1965.
102. EDELSON (J.), SKINNER (C.G.), RAVEL (J.M.) and SHIVE (W.). — 3-cyclohexane-1-DL-alanine, an analog of leucine. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **80**, 416.)
103. BUSTON (H.W.) and BISHOP (J.). — Synthetic alpha-amino-beta-hydroxycaproic acid. (*J. Biol. Chem.*, 1955, **215**, 217.)
104. RENNERT (O.M.) and ANKER (H.S.). — On the incorporation of 5', 5', 5'-trifluoro-leucine into proteins of *E. Coli*. (*Biochemistry*, 1963, **2**, 471.)
105. DOUDOROFF (M.). — Studies on the nutrition and metabolism of *Pasteurella pestis*. (*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1943, **53**, 73.)
106. HIRSCH (M.L.) and COHEN (G.N.). — Amino acid utilisation in bacterial growth. (*Biochem. J.*, 1953, **53**, 25.)

- 106 bis. HAYASHIBE (M.) et UEMURAT. — Release from the feed back inhibition controlling the biosynthesis of isoleucine. (*Nature*, 1961, **191**, 1417.)
107. HARDING (W.M.) and SHIVE (W.). — Biochemical transformations as determined by competitive analogue metabolite growth inhibitions. VIII. An interrelationship of methionine and leucine. (*J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 743.)
- 107 bis. COWIE (D.B.), COHEN (G.N.), BOLTON (E.T.) and ROBICHON SZULMAJSTER (H.). — Amino-acid analog incorporation into bacterial proteins. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1959, **34**, 39.)
108. WUNSCHÉ (J.). — Verbesserte microbiologische bysinbestimmung. (*Die Pharmazie*, 1967, **7**, 91.)
109. STEELE (B.F.), SAUBERLICH (H.E.), REYNOLDS (M.S.) and BAUMANN (C.A.). — Media for *Leuconostoc mesenteroides* p-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. (*J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 533.)
110. PAGE (E.), GAUDRY (R.), GINDRAS (R.). — The anemia producing properties of alpha-amino-epsilon-hydroxycaproic acid. (*J. Biol. Chem.*, 1947, **171**, 831.)
111. McLAREN (A.D.) and KNIGHT (C.A.). — Preparation and microbiological activity of an homolog of lysine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 3, 4478.)
112. SHIOTA (T.), FOLK (J.E.) and TIETZE (F.). — Inhibition of lysine, utilisation in bacteria by S-(beta-aminoethyl) cysteine and its reversal by lysine peptides. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **77**, 372.)
113. BOLINDER (A.A.), LIE (S.) and ERICSON (L.E.). — Plate assay methods for amino acids. I. A sensitive cup plate assay for lysine with *Streptococcus faecalis* ATCC 6057. (*Biotechn. Bioeng.*, 1963, **V**, 131.)
114. SHRIFT (A.). — Selenium metabolism in plants and animals. (*Fed. Proc.*, 1961, **20**, 695.)
115. TUVE (T.) and WILLIAMS (H.). — Identification of seleno-methionine in the proteins of *Escherichia coli* employing the chromatographic fingerprint technique. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 5030.)
116. SCHLESINGER (S.). — Inhibition of growth of *Escherichia coli* and of homoserine O-transsuccinylase by alpha-methylmethionine. (*J. Bact.*, 1967, **94**, 327.)
117. PFISTER (K., 3rd), LEANZA (W.J.), CONBERE (J.P.), BECKER (H.J.), MATZUK (A.R.) and ROGERS (E.F.). — Alpha-methyl-alpha-amino acids. I. Homologs of glutamic acids, methionine and diaminopimelic acid. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 697.)

118. REISNER (D.E.). — Sulfur-containing amino acids. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **78**, 2132.)
119. DYER (H.M.). — Evidence of the physiological specificity of methionine in regard to the methylthiol group: the synthesis of S-ethylhomocysteine (ethionine) and a study of its availability for growth. (*J. Biol. Chem.*, 1938, **124**, 519.)
120. HALVORSON (H.O.) and SPIEGELMAN (S.). — The inhibition of enzyme formation by amino acid analogue. (*J. Bact.*, 1952, **64**, 207.)
121. COLEMAN (W.H.) and MARTIN (W.R.). — *Escherichia coli* resistance to ethionine. (*Proc. Soc. Ex. Biol.*, N.Y., 1967, **126**, 481.)
122. SCHLENK (F.) and TILLOTSON (J.A.). — Formation of S'-ethylthioadenosine from dl-ethionine in yeast. (*J. Biol. Chem.*, 1954, **206**, 687.)
123. LEVINE (M.) and POPEANO (J.V.). — Effect of ethionine on protein content of liver in growing rats. (*J. Biol. Chem.*, 1953, **202**, 597.)
124. LEVINE (M.) and TARVER (H.). — Studies on ethionine. III. Incorporation of ethionine into rat proteins. (*J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 835.)
125. TARVER (H.). — The proteins. In H. Neurath and J. Bailey. (New York, Ed. Academic Press, 1954, **2**, 1199.)
126. GROSS (D.) and TARVER (H.). — Studies on ethionine. IV. The incorporation of ethionine into the proteins of tetrahymena. (*J. Biol. Chem.*, 1955, **217**, 169.)
127. YOSHIDA (A.). — Studies on the mechanism of protein synthesis: incorporation of p.fluorophenylalanine into alpha-amylase of *Bacillus subtilis*. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **41**, 98.)
128. YOSHIDA (A.) and YAMASAKI (M.). — Studies on the mechanism of protein synthesis incorporation of ethionine into alpha-amylase of *Bacillus subtilis*. (*J. Biol. Chem.*, 1959, **34**, 158.)
129. MELLANBY (E.), K.L.B., M.D., F.R.S. — Diet and canine hysteria. (*Brit. Med. J.*, 1946, **2**, 885.)
130. BENTLEY (H.R.), McDERMOTT (E.E.), MORAN (T.), PACE (J.) and WHITE HEAD (J.K.). — Action of nitrogen trichloride on certain proteins. Isolation and identification of the toxic factor. (*Proc. Roy. Soc. B.*, 1950, **137**, 402.)
131. REINER (L.), MISANI (F.), WEISS (P.). — Studies on nitrogen trichloride. Treated prolamines. VI. Suppression of the development of convulsions with methionine. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1950, **25**, 447.)

132. MISANI (F.), REINER (L.). — Studies on nitrogen trichloride treated prolamides. VIII. Synthesis of the toxic factor. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1950, **27**, 234.)
133. BENTLEY (H.R.), McDERMOTT (E.E.), PACE (J.), WHITEHEAD (J.K.) and MORAN (T.). — Action of nitrogen trichloride (« Agene ») on proteins: isolation of crystalline toxic factor. (*Nature*, 1949, **164**, 438.)
134. BENTLEY (H.R.), McDERMOTT (E.), PACE (J.), WHITEHEAD (J.K.) and MORAN (T.). — Toxic factor from « Agenized » proteins: methionine as the essential reactant. (*Nature*, 1950, **165**, 150.)
135. BENTLEY (H.R.). — Action of nitrogen trichloride on certain proteins. II. Synthesis of methionine sulfoximine and other sulfoximines. (*Proc. Roy. Soc.*, 1951, B **138**, 265.)
136. PACE (J.), McDERMOTT (E.). — Methionine sulfoximine and some enzyme systems involving glutamine. (*Nature*, 1952, **169**, 415.)
137. ROTH (J.S.). — The metabolism of methionine sulfoximine. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **52**, 269.)
138. Brevet U.S. 3.295.949 (3 janvier 1967).
139. Brevet U.S. 3.323.895 (6 juin 1967).
140. ROPER (J.A.) and McILWAIN (H.). — Preparation and antibacterial action of some compounds structurally related to glutamine their application in microbiological determination of small quantities of glutamine. (*Biochem. J.*, 1948, **42**, 485.)
141. McILWAIN (H.), ROPER (J.A.) and HUGUES (D.E.). — Relationships in streptococci between growth and metabolism of glutamine. (*Biochem. J.*, 1948, **42**, 492.)
142. BENTLEY (H.R.), McDERMOTT (E.E.) and WHITEHEAD (J.K.). — Action of nitrogen trichloride on proteins: as synthesis of the toxic factor from methionine. (*Nature*, 1950, **165**, 735.)
143. WAELSCH (H.), OWADES (P.), MILLER (H.) and BOREK (E.). — Glutamic acid antimetabolites: the sulfoxide derived from methionine. (*J. Biol. Chem.*, 1946, **166**, 273.)
144. PERKINS (J.P.), LOUIE (D.D.) and ARONSON (J.N.). — Effect of some amino acid analogues on *Bacillus cereus* sporulation using static and shaken cultures. (*Can. J. Microbiology*, 1963, **9**, 791.)
145. MOLHO (D.) et MOLHO-LACROIX (L.). — De quelques dérivés, donateurs de méthyle, capables de se substituer à la méthionine, pour la croissance de *E. coli*, B12 dépendant, souche WC 113-3. (*Bull. Soc. Chim. Belges*, 1956, **55**, 153.)

146. VOLCANI (B.E.) and SARID (S.). — Relationship between methionine and aromatic amino-acids in *Escherichia coli*. (*Experientia*, 1957, **12**, 429.)
147. GERSHOFF (S.N.). — Effect of various methionine analogues on bacteriostatic action of methionine sulfoximine. (*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, **87**, 85.)
148. HEATHCOLE (J.C.) and PACE (J.). — Inhibition of the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by the toxic factor from « agenized » Zeim : reversal by l-glutamine. (*Nature*, 1950, **166**, 353.)
149. STEEL (B.F.), SAUBERLICH (H.E.), REYNOLDS (M.S.) and BAUMANN (C.A.). — Media for *Leuconostoc mesenteroides* B-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. (*J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 533.)
150. FORD (J.E.). — A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. (*Brit. J. Nutr.*, 1960, **14**, 485.)
151. FORD (J.E.). — A microbiological method for assessing, the nutritional value of proteins. 3. Further studies on the measurement of available amino-acids. (*Brit. J. Nutr.*, 1964, **18**, 449.)
152. BARTON WRIGHT. — Microbiological assay of the vitamin B complex and aminoacids. (Londres, Pitmann edit., 1952.)
153. ADRIAN (J.). — Dosage des acides aminés par voie microbiologique A.E.C. (*Soc. Chim. Org. Biol.*, 1960, **4**, 121.)
154. BOREK (E.), MILLER (H.K.), SMEINESS (P.) and WAELSCH (H.). — The effect of the sulfoxides from dl-methionine on glutamic acid and glutamine metabolism. (*J. Biol. Chem.*, 1946, **163**, 347.)
155. BOREK (E.) and WAELSCH (H.). — Optical isomerism and antimetabolite effect of sulfoxides derived from methionine. (*Arch. Biochem.*, 1947, **14**, 143.)
156. RABINOWITZ (M.), OLSON (M.E.) and GREENBERG (D.). — Role of glutamine in protein synthesis by the erlich ascites carcinoma. (*J. Biol. Chem.*, 1956, **222**, 879.)
157. LAMAR (C.) and SELLINGER (O.Z.). — The inhibition *in vivo* of cerebral glutamine synthetase and glutamine transferase by the convulsant methionine sulfoximine. (*Pharmacol.*, 1965, I, 14, 489.)
158. JANACEK (K.), CHALOUPKA (J.), VIRES (H.), HAVRANEK (M.). — Regulation of proteins synthesis in *Escherichia coli* by aminoacid analogues. (*Folia Microb.*, 1960, **5**, 207.)
159. MILLER (D.A.) and SIMMONDS (S.). — Phenylalanine and tyrosine metabolism in *Escherichia coli* K 12. (*Science*, 1957, **126**, 445.)

160. BEERSTECHEER (E.) and SHIVE (W.). — Biochemical transformations as determined by competitive analogue metabolite growth inhibitions. III. A transformation involving phenylalanine. (*J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 53.)
161. FOX (W.S.) and WARNER (C.). — Antagonism between phenylalanine and various isomers of phenylalanine in two lactobacilli. (*J. Biol. Chem.*, 1954, **210**, 119.)
162. MITCHELL (H.K.) and NIEMANN (C.). — The competitive inhibition of the metabolism of alpha-amino-acids by their halogenated analogs. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 1232.)
163. MUNIER (R.), COHEN (G.N.). — Incorporation d'analogues structuraux d'aminoacides dans les protéines bactériennes. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 592.)
164. BERGMANN (E.D.), SICHER (S.) and VOLCANI (B.E.). — Action of substituted phenylalanine on *Escherichia Coli*. (*Biochem. J.*, 1953, **54**, 1.)
165. ATKINSON (D.A.), MELVIN (S.) and FOX (S.W.). — Effects of p.fluorophenylalanine on the growth of *Lactobacillus arabinosus*. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **31**, 205.)
166. DAVIX (A.L.), LLOYD (R.), FLETCHER (J.), BAYLISS (L.) and McLORD (T.J.). — The synthesis and biological activities of o.aminophenylalanine and related compounds. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, **102**, 48.)
167. BURCKHALTER (J.H.) and STEPHENS (V.C.). — Synthesis of phenylalanine analogs as antimetabolites. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 1, 56.)
168. BEERSTECHEER (E.) and SHIVE (W.). — Prevention of phenylalanine synthesis by tyrosine. (*J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 527.)
169. DITTMER (K.), ELLIS (G.), McKENNIS (H.) and Du VIGNEAUD (V.). — The effect of amino-acids on the microbiol. growth inhibition produced by thienylalanine. (*J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 761.)
170. Du VIGNEAUD (V.), McKENNIS (H.), SIMMONDS (S.), DITTMER (K.) and BOSWORTH, BROWN (G.). — The inhibition of the growth of yeast by thienylalanine. (*J. Biol. Chem.*, 1945, **159**, 385.)
171. DUNN (F.W.). — Inhibition studies with beta-2-thienylalanine, beta-1-naphthylalanine, p.tolylalanine and their peptides. (*J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, I, 411.)
172. DUNN (F.W.), RAVEL (J.M.) and SHIVE (W.). — Inhibition studies with peptides of thienylalanine and phenylalanine. (*J. Biol. Chem.*, 1956, **219**, 809.)

173. DITTMER (K.). — The synthesis and microbiological properties: of beta-3-thienylalanine a new antiphenylalanine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, I₂, 1205.)
174. BEERSTECHEER (E.) and SHIVE (W.). — Tryptophan as a competitive growth inhibiting analog of phenylalanine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 461.)
175. EDELSON (J.), SKINNER (C.G.), RAVEL (J.M.) and SHIVE (W.). — Structural specificity of some amino acids antagonists. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, IV, 5150.)
176. FLEMING (R.W.), WILLIAMS (F.D.) and coll. — Effect of p.fluoro-phenylalanine and chloramphenicol on chemotaxis in *Escherichia coli*. (*J. Bact.*, 1967, **94**, 855.)
177. GUTHRIE (R.) and TIECKELMANN (H.). — *Proc. London Conf. on Sci. Study of Mental Deficiency*, 1960, 672.
178. COHEN (G.N.) and MUNIER (R.). — Effets des analogues structuraux d'aminoacides sur la croissance, la synthèse des protéines et la synthèse d'enzymes des *Escherichia coli*. (*Biochem. Biophys.*, 1959, **31**, 347.)
179. MUNIER (R.) and COHEN (G.N.). — Incorporation d'analogues structuraux d'aminoacides dans les protéines bactériennes au cours de leur synthèse *in vivo*. (*Biochem. Biophys. Acta*, 1959, **31**, 378.)
180. STEARNS WALTER ROGERS (Ph.D.). — The metabolism of beta-2-thienylalanine in *Bacillus cereus* 5/B. (*Chemistry*, 1961, order n° 62-1621.)
181. COWIE (D.). — *In Carnegie Institution of Washington Year Book*, 1959, **58**, 294.)
182. HENRY (R.J.), SOBEL (C.), CHIAMORI (N.). — Method for determination of serum phenylalanine with use of the Kapeller-Adler reaction. (*Amer. J. Dis. Child*, 1957, **94**, 604.)
183. LADU (B.N.), HOWELL (R.R.), MICHAEL (P.J.) and SOBER (E.K.). — A quantitative micromethod for the determination of phenylalanine and tyrosine in blood and its application in the diagnosis of phenylketonuria in infants. (*Pediatrics*, 1963, **31**, 39.)
184. McCAMAN (M.), ROBINS (E.). — Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1962, **59**, 885.)
185. DELBRÜCK (M.). — Biochemical mutants of bacterial viruses. (*J. of Bacteriol.*, 1948, **56**, 1.)

186. FILDES (P.). — Inhibition of bacterial growth by indoleacrylic acid and its relation to tryptophan; an illustration of the inhibitory action of substances chemically related to an essential metabolite. (*Brit. J. Expl. Pathol.*, 1941, **22**, 293.)
187. BRAWERMAN (G.) and YCAS (M.). — Incorporation of aminoacid analog tryptazan into the protein of *Escherichia coli*. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **68**, 112.)
188. AVAKIAN (S.), MOSS (J.) and MARTIN (G.J.). — The synthesis and microbiological properties of beta-(2-benzothienyl)-alpha-amino-propionic acid. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 3, 3075.)
189. BERGMANN (E.D.). — Synthetic and chemical studies on organic fluorine compounds. (*Bull. Research Council Israel Soc.*, 1961, A.10, 1.)
190. BERGMAN (E.), ESCHINAZI (E.), SICHER and VOLCANI (B.E.). — The action of 5-fluorotryptophan on *Escherichia coli*. (*Bull. Research Soc. Isarel*, 1952, **2**, 308.)
191. MOYED (H.S.) and FRIEDMANN (M.). — Interference with feedback control. A mechanism of antimetabolite action. (*Science*, 1959, **129**, 968.)
192. TRUDINGER (P.A.) and COHEN (G.N.). — The effect of 4-methyl-tryptophan on growth and enzyme systems of *Escherichia coli*. (*Biochem. J.*, 1956, **62**, 488.)
193. ANDERSON (T.F.). — The activity of a bacteriostatic substance in the reaction between bacterial virus and host. (*Science*, 1945, **101**, 565.)
194. FILDES (P.) and RYDON (H.N.). — Inhibition of growth of *Bact. typhosum* by methyl derivatives of indole and tryptophan. (*Brit. J. Expl. Pathol.*, 1947, **28**, 211.)
195. MARSHALL (J.H.) and WOODS (D.D.). — Tryptophan dipeptides in bacterial nutrition. (*Biochem. J.*, 1952, **51**, II.)
196. LESTER (G.) and YANOFSHY (C.). — Influence of 3-methyl anthranilic acid and anthranilic acid on the formation of tryptophan synthase in *Escherichia coli*. (*J. Bact.*, 1961, **81**, 81.)
197. MOYED (H.S.). — False feed back inhibition: inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. (*J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, II, 1098.)
198. BERGMANN (E.D.). — 5-fluoro-tryptophan and its effect on growth of *Escherichia coli*. (*Koninkl. Med. Akad. Wetenschap, Ser. C*, 1954, **57**, 8.)

199. MUNIER (R.), DRAPPIER (A.H.) et coll. — Substitution totale des analogues 5 et 6 fluorés du tryptophane à cet amino-acide dans les protéines d'*Escherichia coli*. Effet de cette incorporation sur la biosynthèse d'enzymes. (C.R. Acad. Sci., série D, Paris, 1967, **265**, 1429.)
200. BRIGEAU (J.). — Dosage microbiologique de l'activité vitaminique B12 d'extrait de foie et de Nuoc Mam. (*Thèse d'Etat*, Université de Paris, 1954.)
201. Association of Official Agricultural Chemists, 9^e éd., Washington, William Horwitz ed., 1960.

INDEX ALPHABETIQUE DES AUTEURS *

- Adrian (J.) : 153.
 Ames (B.N.) : 93.
 Anderson (T.F.) : 193.
 Atkinson (D.A.) : 165.
 Auerbach (V.H.) : 38.
 Avakian (S.) : 188.
- Barton (W.) : 152.
 Baker (R.S.) : 64.
 Beerstecher (E.) : 160, 168, 174.
 Bentley (H.R.) : 130, 133, 134, 135, 147.
 Bergmann (E.D.) : 164, 189, 190, 198.
 Bernard (J.) : 57.
 Biserte (G.) : 31, 32.
 Blass (J.) : 13.
 Boetz : 1, 2.
 Bolinder (A.) : 79, 113.
 Borel (J.P.) : 41 *bis*.
 Borek (E.) : 154, 155.
 Brawerman (G.) : 187.
 Brigeau (J.) : 200.
 Burkhalter (J.H.) : 167.
 Buston (H.W.) : 103.
- McCaman : 184.
 Cancellieri : 48.
 Carter (D.V.) : 50.
 Ceriotti (G.) : 45 *bis*.
 Chat (T.L.) : 9.
 Cohen (G.N.) : 178.
 Coleman (W.H.) : 121.
 Consden (R.) : 32 *bis*.
- McCord : 91, 76, 77.
 Cousin (E.) : 18, 25, 26.
 Cowie (D.) : 71, 107 *bis*.
- Davis (A.L.) : 166.
 Delarue (J.C.) : 55.
 Delbrück (M.) : 185.
 Dittmer (K.) : 100, 169, 173.
 Doudoroff (M.) : 105.
 Dunn (F.W.) : 171.
 Dyer (H.M.) : 119.
- Edelson (J.) : 97, 99, 102.
- Ferger (M.F.) : 70.
 Fildes (P.) : 186, 194.
 Fleming (R.W.) : 176.
 Ford (J.E.) : 150, 151.
 Fox (S.W.) : 67, 161.
- Gershoff (S.N.) : 147.
 Ghadimi (H.) : 30.
 Gross (D.) : 126.
 Guillerm (J.) : 1, 2, 7, 8, 22.
 Guthrie (R.) : 58, 59, 60, 80, 81, 101, 177.
- Halvorson (H.O.) : 120.
 Hansson (E.) : 66.
 Harding (W.M.) : 107.
 Heathcote (J.C.) : 148.
 Henry (R.J.) : 187.
 Hirsch (M.L.) : 106.
 Hopps (H.E.) : 68.

(*) Cités soit dans le texte, soit dans les références bibliographiques.

McIlwain (H.) : 141.

Janacek (K.) : 158.

Jepson (J.B.) : 37.

Jones (R.G.) : 84.

Kavanach : 61.

Kidder (G.W.) : 89.

Kuong (N.L.) : 10.

La Du (B.M.) : 42, 183.

Lamar (C.) : 157.

Landsford (E.M.) : 85.

McLaren (A.D.) : 111.

Legroux (R.) : 35.

Lemonnier (A.) : 47.

Lester (G.) : 196.

Levine (M.) : 123, 124.

Marshall (J.H.) : 195.

Meister (A.) : 63.

Mellanby (E.) : 129.

Mesnard : 11.

Miller (D.A.) : 159.

Misani (F.) : 132.

Mitchell (H.K.) : 162.

Molho (D.) : 145.

Moore (S.) : 52, 53, 54.

Moyed (H.S.) : 83, 191, 197.

Munier (R.) : 163, 179, 199.

Neidle (A.) : 94, 95.

Nguyen an Cu : 16.

Nguyen van Dhin : 17.

Nordmann (J.) : 39.

Norton (S.J.) : 90.

Pace (J.) : 136.

Padieu (P.) : 56.

Page (E.) : 110.

Pal (P.R.) : 98.

Pardee (A.B.) : 88.

Peirrier (J.C.) : 12.

Perkins (J.P.) : 144.

Pfister (K.) : 117.

Polson (A.) : 44.

Rabinowitz (M.) : 156.

Reiner (L.) : 131.

Reisner (D.E.) : 118.

Rennert (O.M.) : 104.

Richard (C.) : 27.

Richmond (M.H.) : 62, 72, 73.

Robison (M.M.) : 87.

Roblin (R.O.) : 49.

Roper (J.A.) : 140.

Rose (E.) : 3, 4, 5.

Roth (J.S.) : 137.

Sarraff (A.) : 36.

Schlenk (F.) : 122.

Schlesinger (S.) : 116.

Shiota (T.) : 75, 112.

Shrift (A.) : 74, 114.

Smith (S.S.) : 78, 86.

Stearns (W.R.) : 180.

Steel (B.F.) : 109, 149.

Stein (W.) : 45, 51.

Tarver (H.) : 125.

Thivolle (L.) : 46.

Troll (W.) : 41.

Trudinger (P.A.) : 192.

Truong van Chom : 15, 21.

Tuve (T.) : 115.

Van Veen : 19, 20.

Vialard Goudou : 14, 23, 24, 33,
34.

Vigneaud (V. du) : 170.

Vogel (H.J.) : 96.

Volcani (B.E.) : 146.

Waalkes (T.P.) : 43.

Waelsch (H.) : 143.

Westley (J.) : 92.

Wunsche (J.) : 108.

Yoshida (A.) : 65, 127, 128.

Zalusky (R.) : 40.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	9
Chapitre I	13
Etude bactériologique relative aux bactéries présentes dans le Nuoc Mam de consommation courante et mise en évidence d'une activité bactériostatique éventuelle.	
Chapitre II	19
Etudes chromatographiques qualitatives concernant les acides aminés dans leur ensemble, les peptides, le tryptophane et ses métabolites, l'histamine, l'histidine et ses métabolites et les acides organiques.	
Chapitre III	36
Méthodes physicochimiques utilisées en vue de l'évaluation de certains acides aminés :	
— par des méthodes chromatographiques, électrophorétiques ou chromatoelectrophorétiques	
— par des méthodes colorimétriques ou spectrophotométriques utilisées en vue de la détermination de la proline, de l'hydroxyproline et la tyrosine	
— tableau récapitulatif concernant l'ensemble de ces déterminations	
Chapitre IV	45
Dosages concernant différentes substances azotées. Azote total, urée, créatinine.	
Problème posé par les bases puriques.	

Chapitre V	48
Élimination éventuelle du chlorure de sodium :	
— par insolubilisation dans un solvant organique	
— par dialyse	
— par un courant d'électrolyse	
Conclusion concernant l'élimination éventuelle du chlorure de sodium.	
Chapitre VI	55
Généralités concernant l'emploi éventuel d'un analogue de structure d'un acide l-aminé en vue du dosage microbiologique de cet acide aminé.	
Chapitre VII	62
Choix d'une bactérie employée dans le dosage spécifique des l acides aminés basé sur l'utilisation des antagonistes inhibiteurs.	
Etude concernant diverses bactéries du genre <i>Bacillus</i> .	
Etude concernant deux bactéries du genre <i>Lactobacillus</i> ou <i>Leuconostoc</i> .	
Chapitre VIII	67
Elaboration d'une technique générale concernant le dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé basée sur le principe de l'utilisation d'un inhibiteur de croissance bactérienne, analogue de l'acide l-aminé à doser.	
Chapitre IX	79
Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-histidine.	
Utilisation de la (thiazole 1.2.4.) 3-alanine.	
Chapitre X	84
Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-leucine.	
Utilisation de la dl-méthyl-2-leucine	
Utilisation de la dl-4-azaleucine.	
Interférence de la l-isoleucine possédant une activité propre antagoniste.	
Chapitre XI	94
Dosage microbiologique de la l-lysine.	
Utilisation de la S-bêta-aminoéthyl-l-cystéine ou thiosine.	

Chapitre XII	99
Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-méthionine.	
Utilisation de la dl-éthionine.	
Utilisation de la l-méthionine-dl-sulfoximine.	
Chapitre XIII	114
Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé de la l-phénylalanine.	
Utilisation de la p.fluorophénylalanine.	
Utilisation de la bêta-thiényl-2-alanine.	
Application de la méthode à d'autres protéolysats que le Nuoc Mam, en particulier à des protéolysats médicamenteux et à des hydrolysats provenant d'aliments.	
Chapitre XIV	125
Dosage microbiologique par diffusion en milieu gélosé du l-tryptophane.	
Utilisation du dl-méthyl-4-tryptophane et du dl-méthyl-5-tryptophane.	
Chapitre XV	130
Dosage microbiologique d'un acide l-aminé basé sur le principe de l'inhibition préalable de la croissance d'une bactérie par un analogue de structure de cet acide aminé, la croissance étant suivie en milieu liquide.	
Chapitre XVI	133
Dosage microbiologique de certains composants du Nuoc Mam, utilisant une souche bactérienne dépendante du composant à doser.	
Conclusion générale	141
Bibliographie	147
Index alphabétique des auteurs cités	163

